

造血幹細胞ニッチの免疫学的傷害メカニズムの解明

浅田 騰

岡山大学病院 血液腫瘍内科

【研究の背景】

血液悪性疾患の根治療法としての同種造血幹細胞移植の代表的な合併症として、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease:GVHD)がある。最近では、骨髄内の造血幹細胞ニッチも GVHD の標的となることが明らかとなっており、その病態解明と治療法の確立は必須である。これまでの研究で、GVHD による骨髄微小環境、すなわちニッチ傷害により造血幹細胞の異常が引き起こされることがわかってきている。骨内膜ニッチ成分である骨芽細胞が GVHD により障害されることが動物モデルとヒト患者検体を使った研究により報告されている¹⁾。

申請者は、これまでの研究で、骨髄中の異なる二つの血管周囲細胞に着目し、細動脈周囲ニッチと静脈周囲ニッチがそれぞれ異なるサイトカインを駆使して造血幹細胞制御に携わっていることを明らかにした²⁾。細動脈周囲ニッチは、造血幹細胞維持に重要なニッチファクターである C-X-C motif ligand 12(CXCL12)を分泌することによって造血幹細胞の維持に働き、一方で、静脈周囲ニッチ細胞は別のニッチファクターである Stem cell factor(SCF)を分泌することにより造血幹細胞の維持に働くことを示した。

骨髄 GVHD の血管周囲ニッチに対する影響を詳細に解析した研究はなく、とりわけ我々が新たに同定した動脈周囲の造血幹細胞ニッチの病態への関与を検討した研究は今までに報告されていない。以上のように、GVHD による骨髄内、造血幹細胞ニッチ障害は、未だ十分に検討されておらず、病態の解明とそれに基づく治療法の開発には、さらなる研究結果の蓄積が必要である。

【目 的】

本研究では、申請者がこれまでに明らかにしてきた、二つの血管周囲ニッチ、すなわち動脈周囲ニッチと静脈周囲ニッチに着目し、GVHD による造血幹細胞ニッチ傷害の発症メカニズムを解明し、新しい治療戦略の糸口を発見することを目標とする。

【方 法】

急性 GVHD モデルマウスとして C3H/HeJ をドナー、C57BL/6 をレシピエントとして用いる骨髄移植モデルを作製した。同種移植群として、ドナーである C3H/HeJ マウスから 5×10^6 個の骨髄細胞と 7.5×10^6 個の脾臓細胞を、8Gy の全身放射線照射を施行した C57BL/6 マウスに経静脈的に輸注した。コントロールである同系移植群として C57BL/6 マウスをドナーとして、同様の細胞数の骨髄細胞と脾臓細胞を C57BL/6 マウスに輸注した。また、血管周囲ニッチ細胞をラベルできるマウスである Nestin-GFP transgenic マウス(C57BL/6 バックグラウンド)をレシピエントとして、同種移植群と同系移植群の両者のモデルを作製した。移植後マウスの末梢血解析として、尾静脈より採血し、末梢血中の白血球数、ヘモグロビン濃度、血小板数を動物用血球計算器にて経時的(7日目、14日目、21日目)に測定した。骨髄細胞の解析として、移植後 21 日目の急性 GVHD モデルマウスならびにコントロールマウスから大腿骨を分離し、造血幹細胞数を FACS にて解析した。

移植後 GVHD マウスでの骨髄血管周囲ニッチ細胞の解析として、移植後 21 日目の急性 GVHD モデルマウスならびにコントロールマウスから脛骨を分離し、collagenase と dispase による digestion を行ったのちに、以下の抗体を使用して骨髄血管

周囲ニッチ細胞をラベルし、FACS にて解析を行った。Biotin-anti-CD45 (30-F11), biotin-anti-TER119 (TER119), PE-Cy7-anti-CD31 (MEC13.3), PE-anti-CD51 (RMV-7), APC-anti-CD140a (APA5), streptavidin APC-eFluor780. CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, CD51⁺, CD140a⁺³, あるいは CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, Nestin-GFP⁺を血管周囲ニッチ細胞として、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁺を血管内皮細胞として測定した。

【結 果】

移植後の末梢血の解析では、移植後 21 日の時点で、同種移植群で白血球数、ヘモグロビン濃度(Hb)ともに有意に低かった(WBC 同系:5450±662, 同種:3327±351, p=0.009, n=10-11, Hb 同系:13.35±0.29, 同種:11.15±0.61, p=0.0054, n=10-11)。移植後 21 日の時点での骨髄の解析では、造血幹細胞数は、同系移植群に比べ同種移植群で有意に少なく(同系:415±135/femur, 同種:65.36±20/femur, p<0.05, n=7-9)、移植後の同種免疫反応により造血幹細胞の回復が障害されていることが示唆された。骨髄内の造血幹細胞ニッチの解析では、CD31⁺血管内皮細胞(同系:6639±595/femur, 同種:3424±547/femur, p<0.01, n=5)、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, CD51⁺, CD140a⁺の血管周囲ニッチともに同種移植群で同系移植群に比較し有意に減少していた。また、Nestin-GFP transgenic マウス(C57BL/6 バックグラウンド)をレシピエントとした急性 GVHD モデルでは、野生型マウスの GVHD モデルと同様、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, Nestin-GFP 陽性の血管周囲ニッチ細胞の減少をみとめた。

【考 察】

これまでの研究で、同種移植後の造血障害は骨髄の造血幹細胞ニッチのうち、骨芽細胞性ニッチが障害を受け、結果として造血幹細胞が障害されるとされている¹⁾。この報告においては、血管周囲ニッチ細胞の一つとして知られている CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞は、急性 GVHD モデルで減少しないとの報告であったが、今回の我々の検討では、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, CD51⁺, CD140a⁺で定義されるニッチ細胞あるいは、CD45⁻, TER119⁻, CD31⁻, Nestin-GFP⁺で定義されるニッチ細胞の両者が同種移植群で有意に減少しており、我々のマウス急性 GVHD モデルにおいては、同種免疫反応による血管周囲ニッチの障害に起因する造血幹細胞障害が生じている可能性が考えられた。しかしながら、2 つの血管周囲ニッチのうちの動脈周囲ニッチ細胞の検討はできておらず、今後行う予定である。また、傷害を受けた骨髄内ニッチの画一的な解析あるいは遺伝子発現解析を行い、傷害メカニズムを明らかにしていく予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの同種造血幹細胞移植後 GVHD の治療は、免疫担当細胞をターゲットとしたものが中心であるが、本研究により、GVHD による造血幹細胞ニッチ傷害のメカニズムが明らかとなれば、血管ニッチを標準とした新たな治療手段開発への糸口となることが期待される。さらに、骨髄 GVHD による造血幹細胞ニッチ障害のメカニズム解明は、骨髄 GVHD だけでなく、再生不良性貧血などの、造血幹細胞ニッチをふくめた微小環境の異常に起因していると思われる他の病態解明にも発展する可能性がある。

【参考・引用文献】

1. Shono Y, Ueha S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K: Blood, 115:5401-5411(2010)
2. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, Wang Z, Fernandez N. F, Birbrair A, Ma'ayan A, Frenette PS: Nat Cell Biol, 19:214-223(2017)
3. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, Mizoguchi T, Bruns I, Kunisaki Y, Frenette PS: J Exp Med, 210:1351-1367(2013)