

第20回麒麟塾

神戸先端医療センター 青山先生

加齢造血幹細胞に ROS 蓄積

老齢末梢血単核球：過酸化脂質代謝物蓄積

加齢により、セレノプロテイン現象が見られる

セレノプロテイン：セリンの高い反応性により抗酸化機能を発揮、例：GPX など

セレノシステイン tRNA 遺伝子をコードする Trsp 欠失→セレノシステイン合成低下

Trsp KO マウス：HSC 機能低下、B 細胞異常

HSC:ROS が蓄積→細胞周期亢進、st-HSC 増加

RNA-seq: NRF2 標的遺伝子 up, 老化関連遺伝子 up

競合移植：時間経過とともに低下、特に B 細胞低下

Trsp KO HSPC：フェロプトーシス亢進

B リンパ球減少：過酸化脂質蓄積、pro-B 以降の B 細胞分化障害、ミエロイド遺伝子が発現しており、移植後 B 細胞→ミエロイド系統への分化スイッチが観察される

Vit.E 過剰食により、一部の表現型が改善

東北大学 綿貫先生

造血幹細胞の代謝システム

HSC aging: SCF, TPO が低いと加齢 HSC がよく増える、

SCF/TPO 低い→若年 HSC apoptosis 加齢 HSC はあまり apoptosis 増えない

解糖系酵素 Pgam1 cKO: 若年マウス HSC 低下、加齢 HSC は影響を受けない

加齢 HSC は解糖系の流量を抑え、ペントースリン酸化経路を多く使用する。

加齢 HSC は ROS の蓄積に対して抵抗性、活発な PPP により ROS 蓄積を抑制している。

加齢 HSC: ミトコンドリア酸化的リン酸化亢進

GO-ATeam2 マウス：ATP2 センサーマウス

ミトコンドリア阻害：若年、加齢 HSC のどちらにもあまり影響しない

解糖系阻害：若年 HSC で ATP 減少、加齢 HSC ではあまりしない

加齢 HSC: 電子伝達系 complex II 由来の ATP 産生能が高い

SDHAF1 は、加齢に伴いタンパク発現が増加する、TPO に制御されている

SDHAF1 過剰発現 HSC は、加齢 HSC 様の代謝、アポトーシス抵抗性を有する

SDHAF1 過剰発現 HSC: 非照射 Rag2 KO マウスへの移植で生着能 up

*加齢造血幹細胞は、ミトコンドリアによるエネルギー産生能はむしろ増加しており、幹細胞としての機能は向上しているとも言える。しかし、分化能は低下している。

東大医科研 小出先生

Clusterin は加齢に伴い増加する。

Clusterin+HSC は加齢に伴い増加する。

Clusterin+ HSC は myeloid/Platelet biased differentiation、末梢血で低下、HSC 分画は保たれる：加齢 HSC の表現型

Culture: Clusterin+ HSC: self-renewal 増加、differentiation 低下、DNA damage 増加、ミトコンドリア活性低下

Clusterin negative HSC have young HSC-like gene signature

Clusterin expression は ER stress によって誘導される

熊本大学 古賀先生

大動脈領域における初期造血発生

造血幹細胞発生期には様々な細胞が混在→scRNA-seq

プレ造血幹細胞：Kit, Mpl 発現 (SCF, TPO の受容体)

SCF/TPO 添加→プレ造血幹細胞から造血幹細胞への分化を誘導

SCF: 動脈内皮細胞、肝芽細胞 TPO: 肝芽細胞 only

プレ造血幹細胞が造血幹細胞になるためには、内皮細胞の微小環境が必要

E9.5 造血性内皮細胞が造血幹細胞になるためには、BMP4 が必要

*発生学と scRNA-seq は相性が良い。プレ HSC を HSC に変える微小環境とは具体的に何か、と聞いたところ、NOTCH は関係していると思うがそれだけでは無い、とのこと。

東大医科研 余語先生

移植後の造血リカバリーはどうなっているのか？

CFU-S: first observation of hematopoietic inflation

Spleen で CMP/MEP が増える、特に CMP が中心

Expanded CMP(exCMP, in vitro で増やした CMP)には Hlf+分画がある：

Spleen における早い造血→移植後の早期造血リカバリーに有用である可能性

MHC class I deficient exCMP: アロ移植可能

ヒト universal exCMP 作製→移植後の血球減少を補う血液製剤として使用できる可能性

Rochester Univ. 川野先生

老化に伴う骨髓微小環境変化は、MDS の病態に影響するか？

Inflammasom related cytokines IL-1/IL-18

MDS 患者の BM plasma には、IL-18/sIL-1R1 の有意な上昇が見られる

高順化 BM-MSC 培養系の確立：macrophage free の純粋な MSC:造血支持能 up

BM-MSC + IL-1: NF-kB up

BM-MSC + IL-18: p38MAPK up

老齢マウス、MDS マウス(NHD13-NUP98-HOX13 Tg)の MSC で IRAK4, NLRP3 up

HSC/MPP/GMP + MSC 共培養：IL1b/IL18 添加で造血細胞増殖

BFU-E 増加赤芽球増加：ここで分化が止まってしまう

IL1R1 シグナル阻害薬は、マウス骨髄の加齢性変化を改善する。

老化 MDS マウス：NHD13 を移植して作製：白血化が遅れ、macrocytic anemia

IRAK4 阻害剤で MDS クローン増殖抑制

* IRAK4 阻害剤は、MDS 細胞に作用して治療効果を示すと言われてきたが、MSC にも作用している可能性があるとのこと。

名古屋大学 古橋先生

Stem Immunology 幹細胞と免疫反応

Immune privileged sites: Eye, Brain など

造血幹細胞ニッチは免疫寛容部位なのか？

造血幹細胞 allo 移植：骨髄内に生着するものがある

動脈が静脈につながる、血管がターンする場所(Hair pin curve)に all 生着 HSC が存在する。

NO-high HSC: quiescent, 2nd 移植で強い生着能

NO-high HSC: CD200 hi capillaries に囲まれる：骨の端、免疫分子を発現、繊毛あり

IFT20 KO in vessels(繊毛消失) CD200 KO in vessels / eNOS KO in NO-hi HSCs

→幹細胞機能低下

eNOS→Autophagy に関与

シノビ therapeutics 矢野先生

iPS 細胞由来 Treg の作製

通常の培養では iPS 細胞から CD8 陽性細胞だけが分化する

3D 培養法を用いると、iPS 細胞から CD4+細胞が得られる（何故？興味深い）

ただし CD4 陽性細胞は、炎症性細胞。

CDK8/19 阻害薬、TNFR2 アゴニスト抗体、Rapamycin、TGFb を添加することで、

FOXP3+Treg を産生できる、FOXP3 遺伝子領域の脱メチル化も引き起こす

iPS-derived Treg は、CTL の分裂を抑制し、プライマリ Treg と同様に GVHD を抑制した。

Bayler College of Medicine 神原先生

口腔内細菌叢と GVHD

口内炎強い-慢性 GVHD

慢性 GVHD 発症例では口腔内細菌叢の多様性が低下する。

Oral Ligature Placement(OLP)モデルは、局所炎症と口腔 dysbiosis を誘発する

OLP モデルでは aGVHD に差はないが、cGVHD が悪化する

口腔 dysbiosis は移植後腸管内 Enterococcus の増殖と関連する

口腔 dysbiosis と病原性細菌により GVHD が増悪する

口腔 dysbiosis に対する歯科的治療介入により cGVHD が改善する

抗生剤軟膏の塗布により口腔内病原性が改善し cGVHD も改善する。

北海道大学 長谷川先生

肝臓 GVHD における組織幹細胞の役割

胆管上皮細胞が GVHD の主な標的

aGVHD マウスモデル MHC 半合致移植(B6 + BDF1)

肝臓 GVHD 中期に一過性胆管上皮の増加を認め、その後低下する

胆管上皮幹細胞(BDSCs)は胆管上皮に存在し、定常状態では静止状態にあるが、胆管損傷時に活性化して胆管上皮の再生に寄与する。

オルガノイド形成能を指標に BDSC を定量

Allo 群では BDSC が一過性に増加し、後期に減少する

IFN α や TNF- α はオルガノイド形成を阻害しない。

TGF β はオルガノイド形成を阻害

SB-431541(TGF β 阻害剤)によりオルガノイド形成 up

Liver GVHD では T 細胞に続いてマクロファージが浸潤し、TGF β を産生する。

TGF β 阻害剤は、BDSC を増やし、肝臓 GVHD を改善する

大阪大学 藤本先生

GVHD に対するファージ療法の開発

同種移植と腸内細菌：関係はあるが治療につながっていない。

胃潰瘍、胃がんのピロリのように、治療対象となるものはないか？

GVHD 患者糞便由来の強毒性 *E. faecalis*: これらは VRE(バンコマイシン耐性 enterococcus)ではない

患者由来の *E. faecalis* 投与で、マウスモデル GVHD 悪化

E. faecalis 特異的な溶菌酵素を投与すると GVHD の発症が抑制される

*移植前に予防的に抗菌薬投与をすることはあるが、特定の腸内細菌を標的とした予防投与をする時代が来るのか？ また、ファージ療法はロシアでは一般的らしい。

東京医大 角南先生

Trip1: pseudokinase

Cop1: Trib1 をアダプターとして CEBP family を分解する

Cop1 cKO マウス→Cop1 KO derived AML 細胞の作製

Trib1-AML は、Cop1 KO で増殖低下

Cop1 KO は、vivo で Trib1-AML の増殖を抑制する

Cop1 KO は Trib1 タンパク発現を蓄積させる

COP1 KO Cebpe (Cebpa の標的)発現上昇

Trib1/Cop1 PPI 阻害薬の開発

VavCre COP1 KO は早期に死亡する。

弘前大学 佐藤先生

ダウン症候群

→ 5-10% Transient abnormal myelopoiesis (TAM) : Trisomy + Gata1 mutation

→ 20 % Myeloid leukemia with Down syndrome (ML-DS): 上記に加え、付加的遺伝子異常
ML-DS と TAM を比較し、ML-DS に特徴的なゲノム異常を抽出：

Cohesin, Epigenetics, Tyrosin kinase...

頻度の高いもの ZBTB7A, RUNX1, IRX1

IRX1 loss of function type

ZBTB7A: loss of function

IRX1 over into IRX1-mutated ML-DS cell line

IRX1 mutation: MYC up

ML-DS cell lines are sensitive to BRD4 inhibitor

RUNX1-PTD (exon3-6or7 の重複)

No difference in the binding specificity between RUNX1C-PTD and WT RUNX1

RUNX1 PTD 一部細胞質: partial loss of function?

予後不良因子 : ZBTB7A, JAK2, CDKN2A, TP53

*乳児 ALL で高発現することが知られている IRX1 の LOF 変異が ML-DS で認められる
とのこと。RUNX1-PTD は、loss of function? だとすると、機能低下した RUNX1 が 3 つ
あることの意義は？これらは ML-DS に特徴的なのか、他の AML などでも見られるの
か？

熊本大学 七篠先生

ATL における TGFb 経路の意義

HTLV1:最近サルからヒトに伝搬、HTLV2: 大昔にさるからヒトに伝搬

HTLV1 では G-A 変異が多い : APOBEC3 の防御反応

HTLV2 では G-A 変異少ない

HBZ は APOBEC3G に結合する

Human APOBEC3G enhances TGFb pathway by HBZ

TGFb inhibitor inhibits ATL growth

TGFb upregulated BATF3, MYC, IRF4

TGFb is important for ATL tumor growth

HBZ は ATL 細胞の核に多く局在、TGFb 添加でさらに増える

Carrier の細胞では HBZ は細胞質、TGFb には反応しない。

* TGFb は、一般に細胞増殖を抑えることが多いが、ATL 細胞は増やすらしい。

東京大学 山岸先生

EZH1/2 阻害薬の作用機序

ATL 細胞 H3K27me3 亢進

EZH1/2 二重阻害薬の発見 バレメトスタット

治療前後の患者サンプルを用いて解析

治療後 TP53 変異など悪性クローンも含めて減少

H3K27me3 低下、クロマチン構造正常化

耐性クローンの検出：バレメトスタット結合部位の EZH1/2 変異 50%

TET2 変異、DNMT3A 過剰発現→クロマチン構造が回復

EZH2 1/2 阻害 免疫環境の改善

* TET2 変異、DNMT3A 過剰発現で薬が効かなくなった症例では、ヒストン H3K27me3 は低下したままだが、クロマチン構造は（おそらく DNA メチル化の影響で）治療前と同じような状態に戻るとのこと。

大阪大学 笠井先生

iNKT 細胞 CD1d に提示された Glycolipid を認識する

iNKT 細胞が認識する自己抗原は完全にはわかっていない

CD1d 発現 B16F10 細胞は、マウスで増殖を抑制される

→何かを提示している→血清中の抗原が提示され iNKT 細胞が活性化される

HexCer とサイズが似ている。→ α HexCer

環境にある脂質抗原を提示している

千葉がんセンター 池田先生

なぜ疲弊 TIL(腫瘍浸潤リンパ球)でミトコンドリア機能が低下しているのか？

ヒトがんのミトコンドリア遺伝子には変異が多い

TIL のミトコンドリア変異とがん細胞のミトコンドリア変異が一致

がん細胞から TIL へのミトコンドリア伝播

TIL の一部でホモプラスミーなミトコンドリア変換

NAC 投与でこの変換を抑制できる。

→ TIL の内在性ミトコンドリアは ROS によるマイトファジーによる分解を受けている

USP30 と共に伝播したがん由来ミトコンドリアは、マイトファジーに耐性

細胞外小胞(EV)分泌阻害剤+ICI：併用効果あり

抗 PD1 抗体治療を受けたメラノーマと非小細胞がん：ミトコンドリア変異が予後不良因子

*ミトコンドリアの伝播については以前から報告があったが、信じていない人も多かった。今回、ミトコンドリア遺伝子の変異ががんと TIL で一致する、という証拠を出したこと

で、これが確かにおきていることがはっきりした。しかも、すべてのミトコンドリアががん由来のものに置き換わることもあるらしい。

大阪大学 倉谷先生

腫瘍内の Treg: Th1-Treg Foxp3 high, Tbet high

なぜ Th1-Treg が腫瘍内で高いのか？

Arg1 発現マクロファージの追跡

VeDTR システム：

Cx3cr1 と Arg1 を両方発現する細胞のみを YFP でマーキングし、DT 投与で除去できる

Arg1+TAM 除去で、Th1-Treg が低下し、腫瘍増殖低下

Arg1+ TAM に高発現する液性因子；PF4

PF4 KO マウス：腫瘍増殖低下、Th1-Treg 割合低下

Cx3cr1-Cre/Pf4-flfl mice: 腫瘍増殖低下→マクロファージの産生する Pf4 が Th1-Treg 誘導

PF4 中和抗体により、Th1-Treg 割合減少、抗腫瘍免疫応答増大

Treg 全除去は体重減少、Spleen における免疫活性化：副作用

PF4 high のがん患者の予後は悪い

大阪大学 池田先生

AML に対する CAR-T

AML に結合するモノクローナル抗体ライブラリ 14,000

B 細胞以外に結合しないもの→KG2032

KG2032 が認識する遺伝子：HLA-DRB1

KG2032 は一部のしかし多様な HLA-DRB1 分子を認識する

86 番目のアミノ酸がアスパラギン酸の時には反応しない

HLA-DRB1 発現非血液組織には KG2032 には結合しない