

平成30年4月13日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09508

研究課題名(和文) 高次元サイトメトリー法によるGVHD制御細胞の包括的解析と予後因子の同定

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of GVHD regulated cells by high dimensional cytometry and identification of prognostic factors

研究代表者

村瀬 和幸 (Murase, Kazuyuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90444918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血幹細胞移植後の慢性移植片対宿主病(以下cGVHD)においては、その重症度の個人差が大きいことから、GVHD予測因子の同定や新規制御法の開発が望まれている。本研究では、BH3 profilingに高次元サイトメトリー法を併用することで、移植後のcGVHD制御細胞を包括的に解析し、IL-2療法の有用性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In chronic graft-versus-host disease (cGVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, individual differences in severity are large, so identification of GVHD predictive factors and development of a novel control method are desired. In this study, we comprehensively analyzed cGVHD regulatory cells after transplantation by using high-dimensional cytometry in combination with BH3 profiling and clarified the usefulness of IL-2 therapy.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：GVHD Treg 高次元サイトメトリー

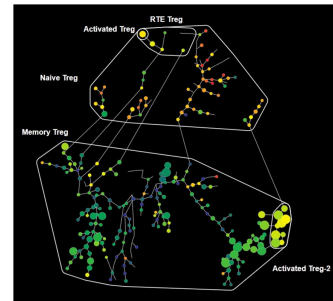
### 1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は難治性血液疾患の、根治的治療が可能となる治療法である。近年の感染予防や支持療法の発達に伴い、移植後早期死亡率が低下し、長期生存患者が増えている。しかしながら、移植後長期経過した後に、慢性 Graft versus host disease (以下 cGVHD) が発症し、皮膚や腸管、肝臓、肺といった様々な臓器に自己免疫性疾患様の症状を呈することが稀ではない。cGVHD の管理が不十分の場合、QOL のみならず生命予後を損ねる。したがって、移植時あるいは移植後長期経過観察中の cGVHD 予測因子の同定と新規治療法の開発が望まれているのが現状である。これまで申請者らは慢性 GVHD の重症度と患者における制御性 T 細胞数 (Regulatory T cells: 以下 Treg) が逆相関を示すことを報告してきた (Murase K7th, et al, Sci Transl Med, 2013)。しかしながら、Treg が減少する分子機構が不明であった。この点を明らかにするために、内因性アポトーシス誘導蛋白の活性部位である BH3 (Bcl2 homology domain 3) 領域のペプチドを細胞に添加することにより変化する、ミトコンドリア膜電位を測定する BH3 profiling 法を導入し (Murase K1st, Haematologica, 2014)、Treg のアポトーシスの起こり易い状態 (Priming) を、Tcon (non-Treg CD4 conventional T cell) および CD8 と比較解析した。その結果、cGVHD 患者において Treg の priming が亢進していることを明らかとし、その分子機構として Bcl2 が関与していることを見出した。さらに申請者らは、健康人ドナー末梢血単核球から純化した Treg と Tcon に対し、Bcl2 inhibitor (ABT-199) 処理を行うことで、前アポトーシス状態 (priming) が誘導しうるか検討した。その結果、Bcl2 inhibitor により、Treg の priming が亢進し、IL-2 を添加により Treg を刺激することで、priming が改善することが明らかとなった。これらの結果から、cGVHD 患者における Treg 数の低下は、Treg が前アポトーシス状態に陥ることで惹起され、その分子機構として、BH3 関連分子を介したミトコンドリアの脱分極が関与することが示された。また、細胞の priming 状態は、サイトカインなどの刺激により解除できることを preliminary ながら見出した。

Treg と cGVHD が関連することは明らかとなったが、最近、cGVHD の制御細胞として、Treg のみならず、CD8 Treg、T follicular helper cells (Tfh)、iNKT、B-regulatory cells (Breg) といった免疫調節細胞が相次いで報告された。したがって、cGVHD の病態は、これまで想定していたよりも複雑であると考えられる。この問題を解決するために、我々は spanning tree progression analysis of density-normalized events (SPADE) による高次元 cytometry data 解析法を導入し、慢性 GVHD 患者におけるリンパ球の包括的な解析を考案した。従来のフローサイトメトリーの解析

法が 2 次元の "gating" による主観的な selection をかけて細分化するのに対し、SPADE においては、すべてのマーカー (最大 32 次元) の同時解析が可能であり、同様の性質をもつ細胞の小集団はバブル (円) の大きさで表現できる。

Figure は Treg を SPADE で細分類した結果であるが、50 以上のバブルに分類され、樹系図により、それを階層的分類することが可能であった。



Treg だけでもこれまで知られていた以上に、複雑な細胞集団であることが、preliminary ながら明らかとされた。さらに、BH3 profiling を導入することにより、どのバブルが cGVHD 発症前後で前アポトーシス状態に陥るか検討予定である。また、本法を用いることにより、Treg のみならず、CD8 Treg、Tfh、iNKT および Breg を同時に包括的に解析可能となる。この SPADE による解析を応用することで、上記の細胞集団における BH3 profiling の比較検討が可能になると想定され、治療経過中の細胞集団の反応性が解析可能と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では同種造血幹細胞移植後の患者から末梢血単核球を分離し、経時的にフォローすることで GVHD 発症群、非発症群に層別化を行い、BH3 profiling 併用高次元 cytometry data 解析法により、前アポトーシス状態に陥っているリンパ球集団を包括的に解析する。リンパ球集団が同定された後は、上述の Bcl2 inhibitor により前アポトーシス状態 (priming) が誘導できるか検討するとともに、priming が IL-2 などのサイトカイン類、で解除できるか検討する。有望な priming 改善法の候補が同定された後は、前臨床試験として、マウスの cGVHD モデルを作成し、priming 解除による GVHD 発症予防効果、発症後の治療効果が認められるか解析する。

### 3. 研究の方法

1) 末梢血単核球における免疫制御細胞の同定、および SPADE tree の作成  
ヒト末梢血単核球は健康人ドナー血液から比重遠心法 (Ficoll-Paque; GE Healthcare) を用いて分離する。分離した単核球を蛍光標識された CD4 抗体、CD25 抗体、CD127 抗体で染色した後、既報に従い Tcon を CD4+CD25negative-low CD127 medium-high、Treg を CD4+CD25medium-high CD127 low とそれぞれを定義し同定する。Treg に関しては細胞を eBioscience の fixation / permeabilization buffer を使用して固定および細胞透過処理を

行った後に細胞内転写因子である Foxp3 抗体で染色して同転写因子の発現を確認する。続いて anti-CD8 抗体、anti-CXCR5 抗体、anti-ICOS 抗体、anti-ICOSL 抗体で染色した後、既報に従い Tfh を CD4+ ICOS+ CXCR5+、CD8 Treg を CD8+ ICOSL+ CXCR5+ とそれぞれを定義し同定する。さらに anti-TCRV $\alpha$ 24 抗体、TCRV $\beta$ 11 抗体、anti-CD3 抗体で染色した後、既報に従い CD4- CD3+ TCRV $\alpha$ 24+ TCRV $\beta$ 11+ を iNKT-cell と定義し同定する。そして anti-CD1d 抗体、anti-CD5 抗体、anti-CD19 抗体で染色した後、既報に従い CD1d(hi)CD5(+)/CD19(hi) と Breg(B10) と定義し同定する。上記の方法にて免疫制御細胞を同定後、Fluidigm 社の Cytobank software でデータ解析を行い、免疫制御細胞をターゲットとした SPADE tree を作成する。

## 2) 免疫制御細胞における BH3 profiling の検討

BH3 profiling に用いるペプチドは既報に従って作成する (PNAS 2010)。分離した末梢血単核球を細胞透過液 (T-E 液; Cell Death Differ 2007) で細胞を懸濁して 12 サンプルに分注する。分注したサンプルに 10  $\mu$ M の BH3 ペプチド (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, HRK) をそれぞれ添加し、30 分間ペプチドと細胞との反応を行う。その後、最終濃度が 22.5  $\mu$ M となるように TMRE (Invitrogen) を添加する。TMRE 添加後さらに 30 分間反応させた後に SPADE tree を用いて、各種免疫制御細胞における TMRE のシグナルを PE - channel にて検出する。溶媒である DMSO (Sigma) を陰性コントロール、脱共液剤である FCCP (Sigma) を陽性コントロールとし、次式にて各ペプチド投与時の脱分極 (% Depolarization) を測定する。

$$\% \text{ Depolarization by peptide} = 100 \times \frac{[(\text{Median PE of DMSO}) - (\text{Median PE of peptide})]}{[(\text{Median PE of DMSO}) - (\text{Median PE of FCCP})]}$$

この % Depolarization がすなわち易アポトーシスの状態である Priming を表している。この結果から各免疫制御細胞がどのアポトーシス関連タンパクによって細胞生存を規定されているかを類推することが出来る。

## 3) 同種造血幹細胞移植後の患者血球による検討

患者末梢血単核球において、上記にて設定した条件で BH3 profiling を施行する。対象は移植日から 180 日以上が経過し、本研究に対する同意のとれた患者とする。4 週毎を目安に患者末梢血単核球を採取し、免疫制御細胞の Priming を検討する。対象患者で cGVHD を発症した場合は治療前および cGVHD 治療後 1 週目、2 週目、4 週目の Priming を検討する。これにより cGVHD 発症群、非発症群、そして治療後の免疫制御細胞における Priming の変化を包括的に解析する。

平成 28 年度以降の研究計画

## 4) in vitro における Priming 誘導および

## Priming 改善剤の検討

上記平成 27 年度の検討によって同定された免疫制御細胞集団を対象に、Priming 誘導および Priming 改善剤の検討を行う。健常人ドナーから対象となる細胞群をセルソーター (BD FACSAria II Cell Sorter; BD Biosciences) を用いて分離し培養を行う。さらに Bcl2 inhibitor である ABT-199 を添加し、同細胞における Priming が誘導されることを検討する。その後、Priming 改善剤の候補として Recombinant human IL-2 (Sci Transl Med, 2013)、Cyclosporin、Tacrolimus (PLoS One 2014)、mTOR 阻害剤 (Immunol Lett, 2014) および narrowband UVB (IJH 2014) を準備。これらの各種治療強度および時間経過によって条件を設定し、治療前後の BH3 Priming を比較することで Priming 改善の至適条件を検討する。

## 5) cGVHD マウスモデル作成、および Priming 改善剤の検討

オスの B10.D2 マウスをドナー、雌の BALB/c マウスをレシピエントとする (8 - 12 週齢)。骨髓細胞は anti-CD90.2 microbeads (Miltenyi Biotec) にて T 細胞除去し、脾細胞は anti-CD90.2 および anti-B220 microbeads (Miltenyi Biotec) にて T 細胞除去を行う。レシピエントに前処置の全身放射線照射 (800 cGy) を行う。ドナーマウスから採取し T 細胞除去した骨髓細胞 (10 x 10<sup>6</sup> 個) と脾細胞 (5 x 10<sup>6</sup> 個) をレシピエントマウスへ移植する。コントロール群として、レシピエントと同じ BALB/c マウスをドナーとし、同様に移植を行う。cGVHD の評価は既報にある通り cGVHD score (健常は 0 点、1cm<sup>2</sup> 以下で 1 点、1-2cm<sup>2</sup> で 2 点、2-5cm<sup>2</sup> で 3 点、5-10cm<sup>2</sup> で 4 点、10-15cm<sup>2</sup> で 5 点、15-20cm<sup>2</sup> で 6 点、20cm<sup>2</sup> 以上で 7 点、尾は 0.4 点、耳と足は 0.3 点とし、最低で 0、最高で 8 点とする) および組織学的な検討 (hematoxylin and eosin 染色、および Masson's trichrome 染色) も併用する (blood 2013)。

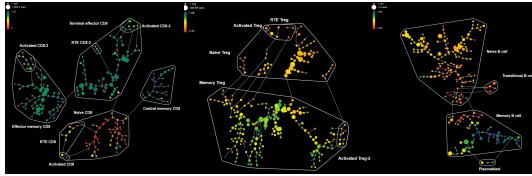
## 6) cGVHD マウスモデルにおける BH3 profiling を使用した発症予測、および Priming 改善剤の検討

上記 cGVHD マウスモデルにおいて、経時的に末梢血での BH3 profiling を行う。これにより (3) にて推定した免疫制御細胞における Priming の変化が cGVHD の発症予測に応用可能かを検討する。さらに上記 (4) にて検討した Priming 改善薬を使用することで cGVHD の治療効果が得られるかを検討する。最終的には BH3 profiling にて cGVHD の発症予測が可能となった時点で、予防的に Priming 改善薬を使用することで cGVHD の発症を未然に防ぐことを目標とする。

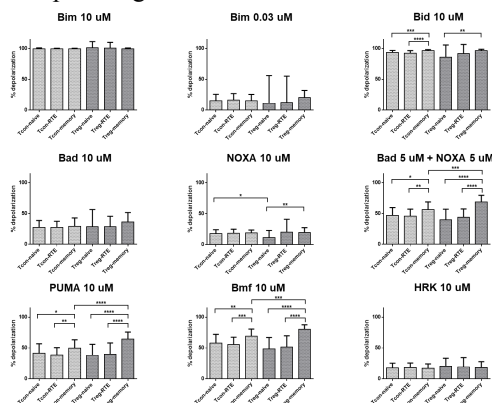
## 4. 研究成果

1) 末梢血単核球における免疫制御細胞の同定、および SPADE tree の作成  
方法に示した通り、既報に従い各種抗体にて

免疫制御細胞を同定後、Fluidigm 社の Cytobank software でデータ解析を行い、免疫制御細胞をターゲットとした SPADE tree を作成した。図は CD4 Treg, CD8 Tcell, B cell の SPADE tree である。



2) 免疫制御細胞における BH3 profiling 検討方法に示した通り、各種細胞における BH3 profiling を施行し、各種分画における priming の差を検討した。図は Treg の細分画における BH3 profiling である。



3) 同種造血幹細胞移植後の患者血球による検討

患者末梢血単核球において、上記にて設定した条件で BH3 profiling を施行した。対象患者で cGVHD を発症した場合は治療前および cGVHD 治療後 1 週目、2 週目、4 週目の Priming を検討した。これにより cGVHD 発症群、非発症群、そして治療後の免疫制御細胞における Priming の変化を解析した。その結果、GVHD 発症患者で免疫制御細胞の BH3 priming が高値となり、Apoptosis しやすい状態であることが判明した。

4) in vitro における Priming 誘導および Priming 改善剤の検討

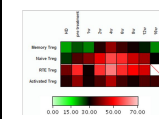
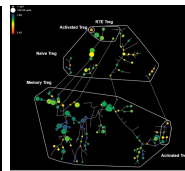
免疫制御細胞集団を対象に、Priming 誘導および Priming 改善剤の検討を行った。健康人ドナーから対象となる細胞群をセルソーターを用いて分離し ABT-199 添加により Priming が誘導されることを確認した。その後、Recombinant human IL-2、Cyclosporin、Tacrolimus、mTOR 阻害剤および narrowband UVB の効果を検討したところ、Recombinant human IL-2 にて Priming 改善効果を認めた。

5) cGVHD マウスモデル作成

方法に示した通り、既報に従い cGVHD マウスモデルを作製した。

6) cGVHD マウスモデルにおける BH3 profiling を使用した発症予測、および Recombinant human IL-2 の検討

上記 cGVHD マウスモデルにおいて、経時的に末梢血での BH3 profiling を行った。その結果、Treg の細分画にて、healthy donor と GVHD



状態、IL-2 treatment 後で Priming の変化を認めた。これにより cGVHD の発症予測に応用できる可能性が示唆され cGVHD の改善も認めた。今後も症例数を増やし、統計学的な有意差が得られるかどうかを検討したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 11 件)

1 Tamura F, Sato Y, Hirakawa M, Yoshida M, Ono M, Osuga T, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Murase K, Kawano Y, Iyama S, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Takimoto R, Kato J. RNAi - mediated gene silencing of ST6GalNAc I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 2016;19:85-97. (査読有)

2 Sato Y, Ohnuma H, Hirakawa M, Takahashi M, Osuga T, Okagawa Y, Murase K, Takada K, Kawano Y, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Okita K, Mizuguchi T, Furuhashi T, Hirata K, Kato J. A dose-escalation study of oxaliplatin/capecitabine/irinotecan (XELOXIRI) and bevacizumab as a first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:587-94 (査読有)

3 Hirayama Y, Ishitani K, Sato Y, Iyama S, Takada K, Murase K, Kuroda H, Nagamachi Y, Konuma Y, Fujimi A, Sagawa T, Ono K, Horiguchi H, Terui T, Koike K, Kusakabe T, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. *Int J Clin Oncol* 2015;20:866-71. (査読有)

4 Kubo T, Kawano Y, Himuro N, Sugita S, Sato Y, Ishikawa K, Takada K, Murase K, Miyanishi K, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Nobuoka T, Hirata K, Takayama T, Mori M, Hasegawa T, Kato J. BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* 2016;19:827-38. (査読有)

5 Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, Iyama S, Takada K, Sato T, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Kawano Y, Miyanishi K, Sawada N, Kato J. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly binding protein 1

reduction in myeloid neoplasms. *Haematologica* 2016;101:437-47. (査読有)

6 Hashimoto A, Sato T, Iyama S, Yoshida M, Iyata S, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Murase K, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Ichimiya S, Kato J. Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease of the Intestine by Expansion of Regulatory T Cells, *PLoS One* 2016;11:e152823. (査読有)

7 Kamihara Y, Takada K, Sato T, Kawano Y, Murase K, Arihara Y, Kikuchi S, Hayasaka N, Usami M, Iyama S, Miyanishi K, Sato Y, Kobune M, Kato J. The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/ $\beta$ -catenin signaling in human multiple myeloma. *Oncotarget* 2016;7:64330-41. (査読有)

8 Iyata S, Sato T, Kuroda H, Nagamachi Y, Iyama S, Fujimi A, Kamihara Y, Konuma Y, Yoshida M, Tatekoshi A, Hashimoto A, Horiguchi H, Ono K, Murase K, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Hirayama Y, Kato J. A phase II trial of small-dose bortezomib lenalidomide and dexamethasone (sVRD) as consolidation/maintenance therapy in patients with multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;78:1041-49. (査読有)

9 Hirakawa M, Matos TR, Liu H, Koreth J, Kim HT, Paul NE, Murase K, Whangbo J, Alho AC, Nikiforow S, Cutler C, Ho VT, Armand P, Alyea EP, Antin JH, Blazar BR, Lacerda JF, Soiffer RJ, Ritz J. Low-dose IL-2 selectively activates subsets of CD4+ Tregs and NK cells. *JCI Insight* 2016;1:e89278. (査読有)

10 Okagawa Y, Takada K, Arihara Y, Kikuchi S, Osuga T, Nakamura H, Kamihara Y, Hayasaka N, Usami M, Murase K, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Activated p53 with histone deacetylase inhibitor enhances L-fucose-mediated drug delivery through induction of fucosyltransferase 8 expression in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One* 2016;11:e0168355. (査読有)

11 Arihara Y, Takada K, Kamihara Y, Hayasaka N, Nakamura H, Murase K, Ikeda H, Iyama S, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Kato J. Small molecule CP-31398 induces reactive oxygen species-dependent apoptosis in human multiple myeloma. *Oncotarget* 1-11,2017

〔学会発表〕(計1件)

1 Ikeda H, Yasushi S, Nakamura H, Iyata S, Yoshida M, Tatekoshi A, Iyama S, Murase K, Takada K, Kikuchi S, Sato T, Kobune M, Kato J. Next generation sequencing of

CD138+ myeloma cells could predict the response rate and appropriate therapy at diagnosis. 58th ASH Annual Meeting & Exposition : Dec 3-6,2016 : San Diego,USA

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

村瀬和幸 (Murase Kazuyuki)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 90444918

### (2)研究分担者

小船雅義 (Kobune Masayoshi)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 90336389