

令和元年5月20日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08743

研究課題名(和文) 移植片対宿主病の組織障害責任分子の同定とその病理学的機構に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Identification and molecular dissection of pathological mechanisms in tissue injury of graft-versus-host disease

研究代表者

小海 康夫 (Kokai, Yasuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20178239

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)：造血幹細胞移植は血液悪性腫瘍などに対する根治的な治療法であり、その適応は免疫不全や代謝疾患がなど多岐にわたっている。しかし重篤な合併症としての移植片対宿主病が造血幹細胞移植の成否に重大な影響をあたえている。そこで血清プロテオミクスと機械学習を組み合わせた方法により移植片対宿主病のバイオマーカーとしてケモカインCCL8を同定した。ヒトとマウスの双方で本分子の発現が生命予後と強く相関することを明らかにした。さらにCCL8遺伝子欠損マウスを作成したところ早期移植関連死が強く抑制された。これらの結果よりCCL8は移植片対宿主病による宿主の死亡に重要であり治療標的分子であることが明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植は血液悪性腫瘍などに対する根治的な治療法であり、その適応は先天性免疫不全や代謝疾患からがんなどの悪性固形腫瘍にまで多岐にわたっている。しかし重篤な合併症としての移植片対宿主病が造血幹細胞移植の成否に重大な影響をあたえ、移植片対宿主病のコントロールが造血幹細胞移植治療の成否を左右する。そのため移植片対宿主病の克服は造血幹細胞移植医療を安全かつ効果的に推進するために必須である。本研究により、今まで困難であった移植片対宿主病の早期客観診断が可能が示唆された。さらに本研究で同定した分子は治療標的分子である可能性が示唆され、造血幹細胞移植の安全で有効な活用に重要な意義をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Acute graft versus host disease (aGVHD) is a major cause of mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). We previously reported that CC chemokine ligand 8 (CCL8), a member of CC chemokine family, is a potential candidate for the diagnostic and prognostic biomarker of aGVHD in human and mice as revealed by proteomic approach. Our study further suggested that the levels of plasma CCL8 is closely correlated with the severity and survival of aGVHD in mice. To elucidate a possible role of CCL8 in aGVHD pathology, we developed CCL8 knockout (CCL8KO) mice using zinc-finger nuclease and transplanted fully allogeneic grafts to CCL8KO mice. We found that CCL8 deficiency in hosts significantly reduces the early mortality of aGVHD and extends survival time significantly after lethal allogeneic HSCT. These findings indicate that CCL8 is intimately involved in mortality of aGVHD and could be a molecular candidate for aGVHD treatment.

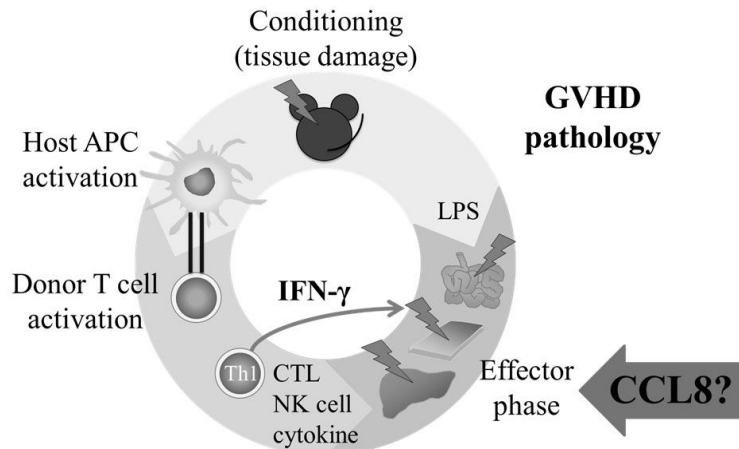
研究分野：医学

キーワード：造血幹細胞移植 移植片対宿主病 白血病 難病根治 組織適合抗原 ドナー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、移植片体宿主病 (GVHD) モデルマウスの血清プロテオミクスにより、ヒト臨床サンプルおよびマウス GVHD における血清での高発現が生命予後と強く相関するケモカイン CCL8 を見出した (Blood. 2008,111:4403-4412、Exp Hematol. 2011, 39(11): 1101-11112)。



CCL8 欠損マウスを作製し、アロ移植を実施したところ、GVHD の予後が劇的に改善された (米国血液学会 56th ASH, 2004)。さらに、アロ移植 CCL8 欠損マウスでは GVHD 標的組織の障害が大幅に軽減され、CCL8 が組織障害に重要な役割を有することが示された。本研究では、GVHD 組織障害における CCL8 の役割を分子レベルで解析し、GVHD の分子標的治療を目指した基礎的検討を行う。

2. 研究の目的

造血幹細胞移植は血液悪性腫瘍などに対する根治的な治療法であり、その適応は先天性免疫不全や代謝疾患など多岐にわたっている。しかし、重篤な合併症としての GVHD が造血幹細胞移植の成否を左右する。そのため GVHD の克服は非常に重要な課題である。

我々はプロテオミクス技術を用いて GVHD マウスモデルにおいて GVHD のバイオマーカーとしてケモカイン CCL8 を同定し、ヒト臨床サンプルおよびマウスにおける血清での高発現が生命予後と強く相関することを示した。血清中に含まれる単一分子として GVHD のバイオマーカーとして同定された唯一の分子であり、内外で高い評価を受けている。(The Hematologist. 2008,5(3):10)

CCL8 の GVHD における役割を解析することを目的として CCL8 欠損マウスを zinc finger nuclease を用いて近交系 C57BL6 のバックグラウンドで確立し、Balb/c アロ造血幹細胞移植を CCL8 欠損マウスに実施したところ、劇的な予後の改善が認められた。その機構の解析を通じ GVHD の分子標的診断治療を目指した検討を行う。

3. 研究の方法

本研究では

CCL8 の GVHD 治療の分子標的としての可能性を検証していく。研究期間内に、

(1)CCL8 の免疫系での役割

(2)標的臓器障害における役割

を検討し、GVHD 治療の分子標的としての CCL8 の可能性を明らかにすることを目指す。

(1)CCL8 の免疫系での役割の検討: 現在までの基礎的研究では、CCL8 欠損はリンパ球系の発生、成熟および活性化には変化をもたらさないことが示唆されている。CCL8 が欠損しても免疫機能に影響がないことが証明されれば、感染症などの GVHD 以外の重篤な合併症への懸念が大幅に懸念される。それゆえ、CCL8 の免疫系での役割の検討は重要である。とくに T 細胞免疫および抗原提示機能および体液性免疫機能について検討する。

(2)標的臓器障害における役割の検討: 現在までの基礎的検討において、GVHD 標的臓器である皮膚、肝臓、腸管における組織障害が、CCL8 欠損により著明に抑制されていることが明らかとなった。このことは、上図 CCL8 の矢印に示したように、CCL8 の主たる作用点は臓器障害のステップにあることを示唆する可能性が指摘される。そこで、障害臓器における CCL8 の機能を検討することを目指すし、CCL8 の発現様式、発現細胞を同定し組織障害との関連を明らかにする。

また、中和抗体やアンタゴニストなどを作成し、局所での分子機構を解析する。

(3)分子標的としての CCL8 の可能性の検討：アロ移植後の CCL8 の再発現と、それに続く GVHD 死亡は CCL8 の分子標的としての可能性を大きく示唆するものである。そこでマウスモデルを用いて、治療標的としての可能性を基礎的に検証し、将来の臨床応用を見据えた評価を実施する。

4 . 研究成果

本研究は GVHD という重篤な疾患の分子マーカーの発見から、当該分子を用いて GVHD の病理機構を明らかにすることのみならず、当該分子を用いた分子標的治療系の確立を最終的に目的とする。我々の現在までの研究により、ケモカイン CCL8 は GVHD の早期診断のみならず GVHD 病勢の把握、重症化予測に有用なバイオマーカーとなる可能性があり、ヒト臨床への応用に対する有用性が高い研究である。GVHD の予防及び治療は従来ステロイドやシクロスポリン、タクロリムスなどの免疫抑制剤によってなされてきたが、本研究はケモカイン及びケモカインレセプターをターゲットとした分子標的療法の開発につながる可能性があり、その点で独創的である。また免疫担当細胞全体に対する強い免疫抑制療法と異なり、ターゲットを限定して GVHD の予防及び治療が可能になれば臨床的に非常に意義深いものとなる。

我々は血清プロテオミクスと機械学習を組み合わせたアルゴリズムを応用して移植片対宿主病のバイオマーカーとしてケモカイン CCL8 を同定した。ヒト臨床サンプルとマウスサンプルの双方の検討で本分子の発現が生命予後と強く相関し、さらに後ろ向き臨床研究により移植後 30 日以内での高発現は早期移植関連死に強く相関することを明らかにした。そこで CCL8 の移植片対宿主病における機能を分析する目的で遺伝子欠損マウスを遺伝子編集法にて作成し、アロ骨髄を移植したところ早期移植関連死が強く抑制されることを見出し、その機構の基礎的検討を続けている。今回の研究により CCL8 欠損マウスではアロ骨髄に対する T 細胞免疫は保たれていること、放射線感受性はマウスの遺伝背景に関係なく保たれていること、移植片対宿主病標的臓器において骨髄球系ミエロペロキシダーゼ陽性細胞群が大きく減少しており組織障害の抑制と深く関わっていることを明らかにできた。

さらに本研究は、すべて日本発のオリジナルであり、日本発のイノベーションとしても重要な意義を有する。知財においてはすでに海外 6 か国で特許権取得済みである。

<引用文献>

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E.

Graft-versus-host disease. *Lancet*. 2009;373(9674):1550-1561.

Hori T, Naishiro Y, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Sonoda T, Mizue Y, Imai K, Tsutsumi H, Kokai Y.

CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2008;111:4403-4412.

Ota A, Yamamoto M, Hori T, Miyai S, Naishiro Y, Sohma H, Maeda M, Kokai Y.

Upregulation of plasma CCL8 in mouse model of graft-vs-host disease. *Exp Hematol*. 2009;37(4):525-531.

Yamamoto M, Ota A, Hori T, Imai S, Sohma H, Suzuki N, Hatakeyama N, Inazawa N, Ito YM, Kimura H, Tsutsumi H, Kokai Y.

Early expression of plasma CCL8 closely correlates with survival rate of acute graft-vs.-host disease in mice. *Exp Hematol*. 2011;39:1101-1112.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

Aiki H, Wada T, Iba K, Oki G, Sohma H, Yamashita T, Kokai Y.

Proteomics analysis of site- and stage-specific protein expression after peripheral nerve injury.

J Orthop Sci. 2018 Aug 9. pii: S0949-2658(18)30187-8. doi: 10.1016/j.jos.2018.07.012.

②Kokai Y, Mikami N, Tada M, Tomonobu K, Ochiai R, Osaki N, Katsuragi Y, Sohma H, Ito Y-M.

Effects of dietary supplementation with milk fat globule membrane (MFGM) on the physical performance of community-dwelling Japanese adults: a randomized, double-blind, placebo-control trial.

J Nutr Sci. 2018 Apr 19;7:e18. doi: 10.1017/jns.2018.8. eCollection 2018.

Yamamoto M, Hori T, Hatakeyama N, Igarashi K, Inazawa N, Suzuki N, Takei N, Ito Y-M, Matsumoto K, Kato K, Tsutsumi H, Kokai Y.

Early expression of serum CCL8 closely correlates to non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Sapporo Med J 2018;86:45-51, doi : 10.15114 / smj.86.45

Kochin V, Kanaseki T, Tokita S, Miyamoto S, Shionoya Yo, Kikuchi Y, Morooka D, Hirohashi Y, Tsukahara T, Watanabe K, Toji S, Kokai Y, Sato N, Torigoe T.

HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses.

Oncoimmunology <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2017.1293214>

Mikami N, Hosokawa M, Miyashita K, Sohma H, Ito Y-M, Kokai Y.

Reduction of HbA1c levels by fucoxanthin-enriched akamoku oil possibly involves the thrifty allele of UCP1: a randomized controlled trial in normal-weight and obese Japanese adults.

J Nutri Sci 2017; 6(e5), 1-9

Kimura M, Sohma H, Matsuki K, Yamaguchi M, Imai S, Kokai Y.

Milk fat globule-EGF-factor 8 is induced from neuronal cells upon stimulation of A β oligomer and specifically localizes in amyloid plaques in the brain of mouse model for Alzheimer's disease.

Sapporo Med J 2017;86:23-34.

Fujita Y, Oki G, Wada T, Iba K, Mikami N, Imai SI, Sohma H, Yamashita T, Kokai Y.

Metallothionein contributes to neuropathic pain in partial sciatic nerve ligated rats.

Sapporo Med J 2017;86:111-120.

Mikami N, Sohma H, Hosokawa M, Abe M, Miyashita K, Kokai Y.

A Protocol for Human Serum Fucoxanthinol Quantitation using LC-MS/MS System.

J Nutri Med Diet Care 2016; 2(3): 019

Tan C, Sasagawa Y, Kamo KI, Kukitsu T, Noda S, Ishikawa K, Yamauchi N, Saikawa T, Noro T, Namura H, Takahashi F, Sata F, Tada M, Kokai Y.

Evaluation of the Japanese Metabolic Syndrome Risk Score (JAMRISC): a newly developed questionnaire used as a screening tool for diagnosing metabolic syndrome and insulin resistance in Japanese.

Enviro Health Prev Med(2016) DOI 10.1007/s12199-016-0568-5

Sohma H, Kokai Y.

Plasma biomarkers in Alzheimer's disease"

"Dementia", ISBN978-953-51-4833-3.June 06, 2016

Kobayashi S, ,Ishii T, Tateno M, Sohma H, Kokai Y. Ito M-Y, Iwamoto T, Furuse K, Tsujino H, Morii H, Ukai W, Hashimoto E, Utsumi K, Kawanishi C.

The effect of APOE 4 allele on brain perfusion SPECT in late onset Alzheimer ' s disease by an automated program, 3DSRT.

Neuropsychiatry 2016; 6(2), 55-63

〔学会発表〕(計 1 件)

第 107 回日本病理学会 Host CCL8 deficiency abolishes early mortality of acute graft-versus-host disease in mice

Kokai Y., et al. 2018,Jun 21, Sapporo, Japan

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 移植片対宿主疾患の検査および治療方法

発明者: 小海康夫、堀司、苗代康可、堤裕幸、今井浩三

権利者: 北海道公立大学法人札幌医科大学

種類: 特許

番号: 特願 2 0 0 9 - 5 2 0 3 4 5

出願年: 2 0 0 8 年

国内外の別: P C T 出願

取得状況 (計 9 件)

名称: 移植片対宿主疾患の検査および治療方法

発明者: 小海康夫、堀司、苗代康可、堤裕幸、今井浩三

権利者: 北海道公立大学法人札幌医科大学

種類: 特許

番号:

日本国: 特許第 5 4 0 3 7 5 2 号、

米国: 9 6 3 1 0 1 4

欧州 (ドイツ・イギリス・フランス): 2 1 6 3 8 9 6

韓国: 1 0 - 1 4 3 2 1 9 1

中国: 2 0 0 8 8 0 0 2 1 4 2 2 . X

オーストラリア: 2 0 0 8 2 6 8 8 4 2

ロシア: 2 4 7 9 8 4 6 (親) 2 6 3 2 4 3 4 (分割)

取得年:

日本国: 2 0 1 3 年

米国: 2 0 1 7 年

欧州 (ドイツ・イギリス・フランス): 2 0 1 3 年

韓国: 2 0 1 4 年

中国: 2 0 1 4 年

オーストラリア: 2 0 1 4 年

ロシア: (親) 2 0 1 3 年、(分割) 2 0 1 7 年

国内外の別: 国内および国外

〔その他〕ホームページ等
<http://web.sapmed.ac.jp/bme/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：堀 司

ローマ字氏名：Hori Tsukasa

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20398324

(2)研究協力者 無

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。