

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19586

研究課題名(和文)同種造血細胞移植後免疫と慢性移植片対宿主病における脂肪細胞分泌サイトカインの役割

研究課題名(英文)A role of adipokine/related protein in chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation

研究代表者

仲宗根 秀樹 (NAKASONE, Hideki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：50757903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、移植後患者において定期的な検体保存を行い、アディポカインやその他のサイトカイン等の測定を継続的に行ってきた。さらに、アディポネクチン関連物質や臓器機能に関連するたんぱく質を同定し合併症の予測や重症度に関連するバイオマーカーとしての有用性を検討している。また、上記のバイオマーカー研究と並行し、in vitroの研究として高分子量アディポネクチンを皮膚線維芽細胞に投与し、濃度依存的に線維化に関連すると考えられるfibronectin、SMAD7の増加、B細胞コロニー増加因子であるNAMPT、免疫チェック因子であるGal9の発現上昇が明らかとなり、今後移植免疫についての検証を行う予定。

研究成果の概要(英文)： In the current study, we routinely cryopreserved samples from actual patients who received allogeneic hematopoietic cell transplantation (HCT), and temporally measured adipokine. Furthermore, various cytokines related to immune response or organ functions were identified through previous studies, and we have currently assessed a clinical role of them as biomarkers for complication prediction or severity after HCT. In addition to the human biomarker study, as in-vitro studies, we revealed that HMW-adiponectin dose-dependently increased the expression of fibronectin and SMAD7 which are thought to be associated with skin fibrosis, NAMPT which is a pre-B cell colony-enhancing factor, and Gal9 which is one of immune checkpoint factors. We have currently investigated the relationship between the pathophysiology of adiponectin and immune reconstitution after HCT.

研究分野：移植免疫 造血幹細胞移植

キーワード：慢性移植片対宿主病 バイオマーカー アディポカイン サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

半世紀前に開発された造血細胞移植は、白血病やリンパ腫などの造血器腫瘍に対する根治的な治療法として発展してきた。しかし移植片対宿主病という新たな合併症を生み出してしまう危険性ははらんでいる。特に移植後後期に出現する慢性移植片対宿主病は、一般的には移植後 100 日目以降に出現し治療に難渋しやすい。その主な臨床症状は、線維化と炎症という自己免疫疾患と類似したものが主で、口腔粘膜障害、眼乾燥、皮膚、肺、消化器系臓器の線維化、筋炎や関節障害など多岐にわたる。このため生活の質(Quality of life, QOL)の低下だけでなく生命を脅かす最大の問題となっている。

これまでも申請者は、慢性移植片対宿主病の病態像を明確にするために、性別不一致移植における慢性移植片対宿主病の免疫バイオマーカー(Nakasone et al. Blood 2015)や、肺を標的とした移植片対宿主病の危険因子(Nakasone et al. Bone Marrow Transplant. 2013, Transplant. Int. 2013)等を世界に向け積極的に報告してきた。今回、慢性移植片対宿主病の多彩な症状の中でも、極端な体重減少、消耗症候群、膵臓萎縮が慢性移植片対宿主病でよく認められることに着目し(Nakasone et al. Bone Marrow Transplant. 2010)、脂肪組織と同種免疫応答(移植片対宿主病)の関係性を検討することにした。脂肪組織で分泌される生理活性物質“アディポカイン”(adiponectin, visfatin, resistinなど)は、生活習慣病の発症だけでなく癌発生や自己免疫疾患にも関与がみられることが昨今報告されており、移植後の同種免疫応答と免疫再構築異常(移植片対宿主病)にも深く関わりを持つ可能性がある(図1)。

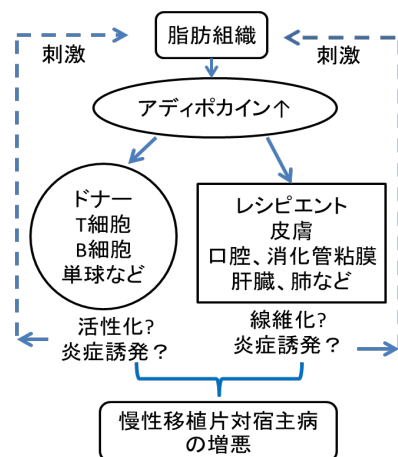


図1. 仮説の模式図

アディポカインの上昇が、ドナー免疫細胞を活性化し、レシピエントの組織の線維化を促すことで、慢性移植片対宿主病を増悪につなげると考えている。また、こうした作用がさらに脂肪細胞/組織を刺激し、炎症の悪循環をきたすと考えている。

本研究ではアディポカインによる同種免疫応答への修飾作用と慢性移植片対宿主病での役割を明らかにする。一見無関係にも思える代謝内分泌の視点から、移植後免疫再構築異常に伴う慢性移植片対宿主病の病態ネットワークを新たにとらえる事を目標とする。

2. 研究の目的

申請者は最近、脂肪細胞から分泌される生理活性物質(アディポカイン)の一つである adiponectin が、造血細胞移植後の慢性移植片対宿主病患者で上昇していることを報告した。慢性移植片対宿主病は、移植後免疫再構築の異常に伴う同種免疫の過剰応答と考えられている。症状は各臓器の線維化、極端なるい瘦などがあげられ、患者生活の質は著しく低下し、治療も長期化し難渋しやすい。本研究では、(a) 慢性移植片対宿主病の発症の有無による患者血中アディポカインの濃度の相違、(b) 各アディポカインによる、同種免疫応答の担当細胞への修飾作用、(c) 標的臓器(皮膚等)への修飾作用を明らかにする。代謝内分泌という別視点を通して、移植後免疫再構築異常に伴う慢性移植片対宿主病の病態ネットワークを新たにとらえ直すことで、新規治療法の可能性を模索する。

3. 研究の方法

(1) 慢性移植片対宿主病のバイオマーカーとしての有用性の確認

申請者はアディポカインの一つである高分子量 adiponectin が、慢性移植片対宿主病患者で上昇していることを報告した(Nakasone et al. Blood 2011)。しかし、その上昇が慢性移植片対宿主病発症前から観測されるものなのか、また治療反応性を予測しうるかはわかっていない。さらに adiponectin 以外のアディポカインでの検討は未だなされていないのが現状である。そこで、各アディポカインやその関連臓器機能に関連する生理活性物質が、慢性移植片対宿主病のバイオマーカーとして、1) 発症予測(高濃度群で高いと予想)、2) 重症度分類(重症度が上がるにつれ重症度も上がると予想)、3) 治療予後予測(奏功例では濃度は減少と予想)のいずれに有用であるかの特定を試みた。具体的には、同種造血細胞移植患者を対象に、同種移植後 3, 6, 9, 12 か月の血液を単核球と血漿に分割して保存し、血漿中のアディポカイン濃度を ELISA または蛍光マイクロビーズ法を用いて測定する。これによりアディポカインが慢性移植片対宿主病の病態生理ネットワークの一部として変化する事を確認する。

(2) アディポカインによる慢性移植片対宿主病の標的細胞、組織への修飾作用

皮膚線維化は慢性移植片対宿主病でよく認められる症状であり、高分子量 adiponectin が慢性移植片対宿主病患者で上昇していたことから (Nakasone et al. Blood 2011)、慢性移植片対宿主病の症状増悪に一役買っている可能性がある。同様に他のアディポカインも標的臓器や組織での線維化や炎症を誘発増長する可能性がある。

そこで、*in vitro* でヒト皮膚線維芽細胞や粘膜上皮細胞での細胞外基質とその代謝酵素類の発現について、各アディポカインの濃度に応じた変化を明らかにする。こうして標的細胞、組織への直接的な修飾作用を明らかにすることで、アディポカインによる同種免疫応答への修飾作用や、移植片対宿主病の発症増悪の一因となることを確認する。

4. 研究成果

(1) 移植後患者において定期的な検体保存を行い、アディポカインやその他のサイトカイン等の測定を継続的に行ってきた。さらに、アディポネクチン関連物質や臓器機能に関連するたんぱく質を同定の上、合併症の予測や重症度に関連するバイオマーカーとしての有用性を検討しており、現在、非再発死亡などの合併症に有用なマーカーとして後方があげられ、さらに症例を蓄積し validation を行う予定。

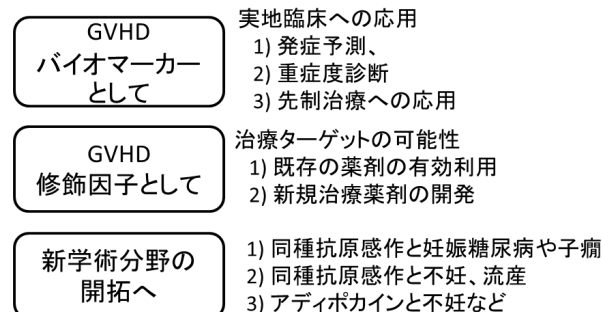
(2) また、上記のバイオマーカー研究と並行し、*in vitro* の研究として高分子量アディポネクチンを皮膚線維芽細胞に投与し、濃度依存的に線維化に関連すると考えられる fibronectin、SMAD7 の増加、B 細胞コロニー増加因子である NAMPT、免疫チェック因子である Gal9 の発現上昇が明らかとなり、今後移植免疫についての検証を行う予定。

本研究では、アディポカインによる同種免疫応答への修飾作用と慢性移植片対宿主病での役割を明らかにすることにより、一見無関係にも思える代謝内分泌の視点から、移植後免疫再構築の異常とそれに伴う慢性移植片対宿主病の病態ネットワークを新たにとらえ直す基盤となると考えている。

現状では、慢性移植片対宿主病の治療は、古典的なステロイドの長期投与であり、免疫能低下による日和見感染症の危険も高く、治療関連死亡が大きな問題となっている。このため過剰な同種免疫応答を抑えつつ、同種移植による抗腫瘍免疫効果を維持するために、慢性移植片対宿主病の病態ネットワークに基づいた特異的な治療法の開発が急務である。本研究は、慢性移植片対宿主病のバイオマーカーの模索にとどまらず、同種免疫および慢性移植片対宿主病を別視点からとらえ直すことで、代謝内分泌系疾患の薬剤を利用

した新規治療への応用につながると考えている。さらに、新規視点でとらえ直すという意味では、今後、他疾患（たとえば妊娠合併症等）に同種免疫の視点からアプローチし、新たな学術分野開拓につながることを期待している (図 2)。

図 2. 本研究の成果と予想される波及効果



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)

移植関連論文を抜粋

[雑誌論文](計 6 件)

Nakasone H, Fuji S, Yakushijin K, Onizuka M, Shinohara A, Ohashi K, Miyamura K, Uchida N, Takanashi M, Ichinohe T, Atsuta Y, Fukuda T, Ogata M; Complication Working Group of Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of total body irradiation on successful neutrophil engraftment in unrelated bone marrow or cord blood transplantation. *Am J Hematol.* 92:171-178, 2017.

Kameda K, Nakasone H, Komiya Y, Kanda J, Gomyo A, Hayakawa J, Akahoshi Y, Tamaki M, Harada N, Kusuda M, Ugai T, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Sato M, Tanihara A, Wada H, Terasako-Saito K, Kikuchi M, Kimura SI, Kako S, Kanda Y. Positive Cytotoxic Crossmatch Predicts Delayed Neutrophil Engraftment in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation from HLA-Mismatched Related Donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 23:1895-1902, 2017

Akahoshi Y, Kimura SI, Gomyo A, Hayakawa J, Tamaki M, Harada N, Kusuda M, Kameda K, Ugai T, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Sato M, Terasako-Saito K, Kikuchi M, Nakasone H, Kako S, Kanda Y Delayed platelet

recovery after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Association with chronic graft-versus-host disease and survival outcome. Hematol Oncol. 36:276-284,2018

Kameda K, Kako S, Hayakawa J, Akahoshi Y, Komiya Y, Harada N, Ugai T, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Sato M, Kanda J, Tanihara A, Wada H, Terasako-Saito K, Kimura SI, Kikuchi M, Nakasone H, Kanda Y ; Safety of avoiding systemic corticosteroid administration for grade II acute graft-versus-host disease limited to the skin. Ann Hematol. 97:169-179,2018

Kawamura K, Nakasone H, Kurosawa S, Yoshimura K, Misaki Y, Gomyo A, Hayakawa J, Tamaki M, Akahoshi Y, Kusuda M, Kameda K, Wada H, Ishihara Y, Sato M, Terasako-Saito K, Kikuchi M, Kimura SI, Tanihara A, Kako S, Kanamori H, Mori T, Takahashi S, Taniguchi S, Atsuta Y, Kanda Y. Refractory Graft-Versus-Host Disease-Free, Relapse-Free Survival as an Accurate and Easy-to-Calculate Endpoint to Assess the Long-Term Transplant Success. Biol Blood Marrow Transplant. (in press)

Kumar AJ, Kim S, Hemmer MT, Arora M, Spellman SR, Pidala JA, Couriel DR, Alousi AM, Aljurf MD, Cahn JY, Cairo MS, Cutler CS, Farhan S, Gergis U, Hale GA, Hashmi SK, Inamoto Y, Kamble RT, Kharfan-Dabaja MA, MacMillan ML, Marks DI, Nakasone H, Norkin M, Qayed M, Ringden O, Schouten HC, Schultz KR, Solh MM, Teshima T, Urbano-Ispizua A, Verdonck LF, Gale RP, Hamilton BK, Majhail NS, Loren AW. Graft-versus-host disease in recipients of male unrelated donor compared with parous female sibling donor transplants. Blood Adv. (in press)

〔学会発表〕(計 3 件)

Hideki Nakasone, Misato Kikuchi, Yu Akahoshi, Koji Kawamura, Yuko Ishihara, Miki Sato, Kiriko Terasako-Saito, Kazuki Yoshimura, Yukiko Misaki, Ayumi Gomyo, Jin Hayakawa, Masaharu Tamaki, Machiko Kusuda, Aki Tanihara, Kazuaki Kameda, Hidenori Wada, Shun-ichi Kimura, Shinichi Kako, Yoshinobu

Kanda: CD34-positive monocytes mobilized by G-CSF in donor peripheral blood and clinical outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation from related donors. EBMT 44th Annual Meeting, March 18-21, 2018, Lisbon, Portugal, 国外

仲宗根秀樹、田淵 健、内田直之、大野裕樹、高橋 聡、松橋佳子、香西康司、宮腰重三郎、福田隆浩、一戸辰夫、高梨美乃子、加藤剛二、熱田由子、矢部普正、神田善伸：臍帯血移植における最適細胞数が得られない場合の CD34 陽性細胞と有核細胞数の優先度。第 79 回日本血液学会学術集会，2017/10/20，国内

仲宗根秀樹、菊地美里、赤星祐、河村浩二、石原優子、佐藤美樹、寺迫桐子、吉村一樹、三崎袖季子、後明晃由美、早川仁、玉置雅治、楠田待子、谷原亜紀、亀田和明、和田英則、木村俊一、賀古真一、神田善伸 G-CSF 動員中のドナー血中 CD34 陽性単球検出率と同種移植後イベント。第 40 回日本造血細胞移植学会，2018/2/1-3，国内

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲宗根 秀樹 (NAKASONE, Hideki)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：50757903

(2)研究分担者
該当なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし