

平成 30 年 5 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19658

研究課題名(和文)ケモカインCCL8欠損による移植片対宿主病の抑制作用とその機構に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for the inhibition of GVHD due to CCL8 deficiency

研究代表者

五十嵐 敬太(Igarashi, Keita)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70580017

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):同種造血細胞移植の重要な合併症である移植片対宿主病(GVHD)におけるケモカインCCL8の役割を解析するため、致死性急性GVHD誘導マウスモデルを用いた移植実験を行った。結果、レシピエントあるいはドナーマウスのどちらか一方でCCL8の発現が欠損している移植モデルにおいては生存が著明に改善していた。レシピエントとドナーマウスともにCCL8の発現が欠損している移植モデルでは生存の改善は認めなかった。CCL8は急性GVHDの病態において重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文): Acute graft-versus-host disease (GVHD) is a serious complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). To elucidate a possible role of CCL8 in acute GVHD pathology, we performed murine lethal acute GVHD models of allo-HSCT using CCL8 knockout mice. As a result, the early mortality of the models using CCL8 knockout mice as either recipients or donors is markedly reduced compared to those of wild type control. The early mortality of the models using CCL8 knockout mice as both recipients and donors was not improved. This observation suggests CCL8 is closely involved in acute GVHD pathology.

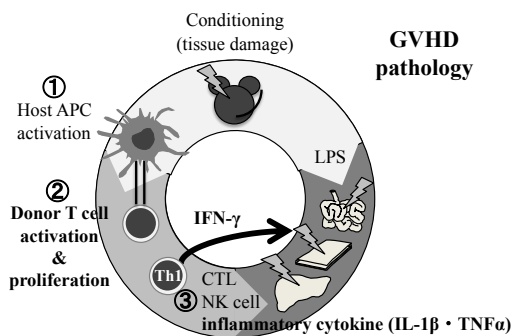
研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：急性移植片対宿主病 CCL8 造血幹細胞移植

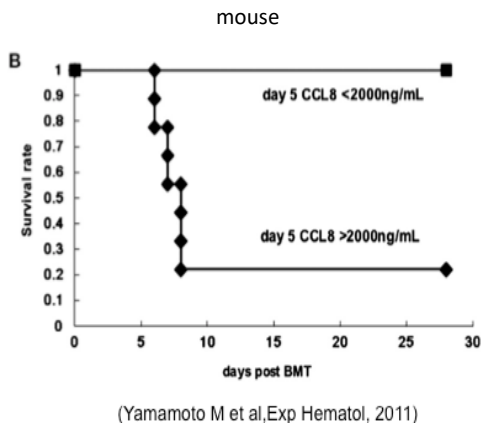
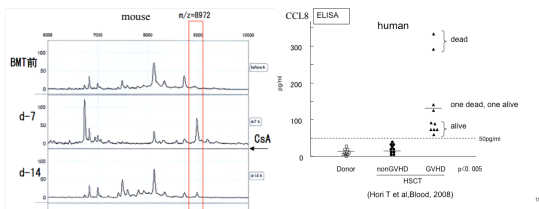
1. 研究開始当初の背景

造血細胞移植は、多岐にわたる様々な疾患の根治療法として現在では広く施行されている。移植片対宿主病(GVHD)は、その症状発現や重篤度が移植のアウトカムを左右する造血細胞移植の重要な合併症である。しかし、GVHDの正確な早期診断法や、治療抵抗性の症例への golden standard となる治療法はいまだ確立されていない。

急性GVHD発症には3段階のステップがあることが提唱されている。つまり急性GVHDは、①前処置による抗原提示細胞の活性化、②ドナーT細胞の活性化・増殖、③細胞性免疫及び炎症性サイトカインによる宿主標的臓器(組織)の障害、という各段階をふみ発症するとされている。



我々はこれまでにプロテオミクスを用いた研究により、ヒト・マウス両者の急性GVHDのバイオマーカー候補としてケモカインCCL8を同定した。また、マウス移植モデルでは、移植後5日目の血漿CCL8値が高いほど生存率が低下することが示された。



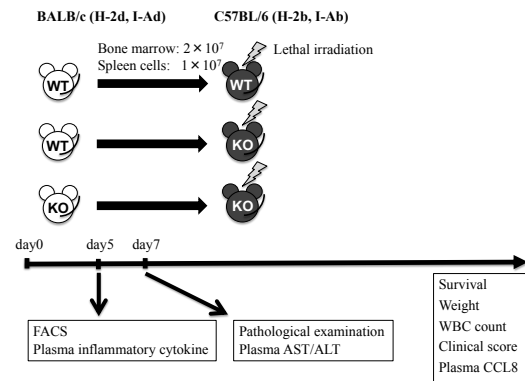
2. 研究の目的

本研究では、CCL8 ノックアウト(CCL8KO)マウスを用いた造血細胞移植後に、そのGVHDの重篤度と生存率を解析する。また、急性GVHD発症の2段階目(ドナーT細胞の活性化)と3段階目(ホストの組織障害)の所見を比較解析し、急性GVHDの病態におけるCCL8の作用機序を詳細に解析する。これらの実験により、CCL8がGVHDの有用なバイオマーカー候補であり、移植片対白血病/腫瘍効果(GVL/GVT効果)を保持した分子標的治療のターゲットとなりうることを検証する。

3. 研究の方法

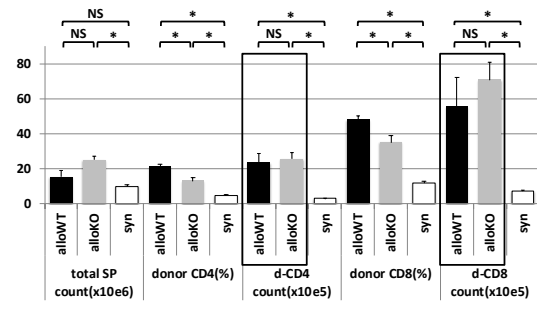
CCL8KOマウスを用いた致死的GVHD誘導モデルによる造血細胞移植を施行し、そのアウトカムを解析する。

ドナー・レシピエントともにCCL8KOの移植群、レシピエントのみCCL8KOの移植群、ドナーのみCCL8KOの移植群を、ドナー・レシピエントともに野生型の移植群とアウトカムを比較解析する。生存解析、体重・末梢白血球数・clinical score・血漿CCL8値の経過、病理組織学的検査、血漿肝機能検査、フローサイトメトリによるドナーT細胞の解析、血漿の炎症誘発性及び炎症性サイトカインの測定を実施する。



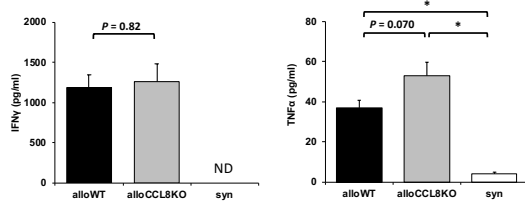
4. 研究成果

(1) レシピエントのみCCL8KOマウスの致死的GVHD誘導移植モデルと、ドナーとレシピエント両者とも野生型マウスの致死的GVHD誘導移植モデルのアウトカムを、GVHDをきたさない同系移植モデル(ドナー、レシピエントともにC57BL/6マウス)のアウトカムと比較した。移植後5日目にフローサイトメトリにて各移植群のマウス脾臓細胞におけるCD4及びCD8陽性ドナーT細胞数・割合を比較した。結果、それぞれの致死的GVHD誘導移植モデル群においてCD4及びCD8陽性ドナーT細胞数は、両群とも同系移植の対照群より著明に増加していた。レシピエントのみCCL8KOマウスである移植群とドナー・レシピエントともに野生型の致死的GVHD誘導移植モデル群同士では、CD4及びCD8陽性ドナーT細胞数に有意差を認めなかった。



NS: not significant, *: p < 0.05 Student's t-testで解析

同時に採取した血漿中の Th1 細胞活性化に関わる炎症誘導性サイトカインである IFN γ や組織障害に直接関わる TNF α を測定した結果、いずれも同系移植の対照群より著明に増加し、両者で有意差を認めなかった。むしろ、TNF α はレシピエント CCL8KO 群の移植モデルにより増加傾向であった。

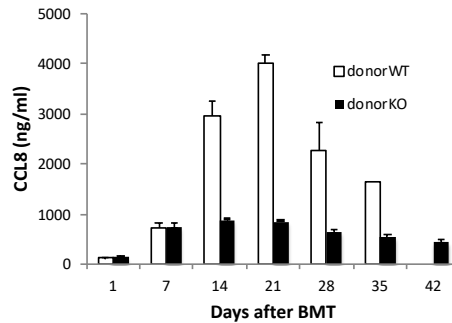
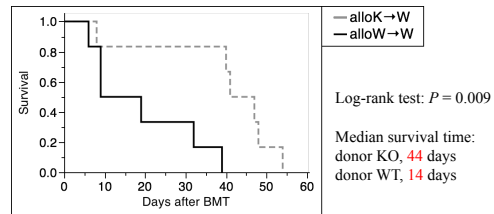
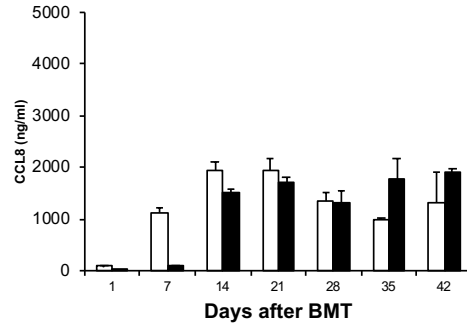
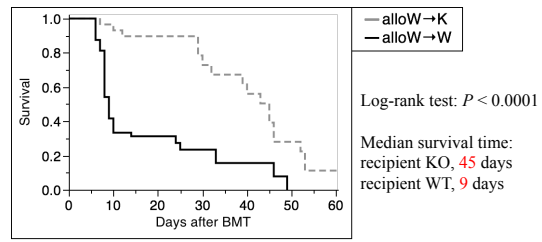


ND, not detected; *, p < 0.05 Student's t-testで解析

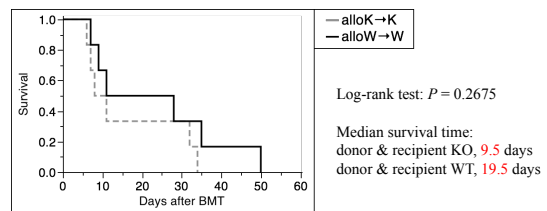
レシピエントの CCL8 欠損によっても、ドナー CD4 及び CD8 陽性細胞増加や IFN γ ・TNF α 増加が保持されることから、CCL8 は急性 GVHD の病態において effector phase において作用し、CCL8 発現を抑制しても GVL/GVT 効果を温存できる可能性が示唆された。

(2) 致死性の GVHD 誘導移植マウスモデルにおいて、ドナー・レシピエントともに野生型の移植モデルを対照群として、①レシピエントのみ CCL8KO マウスの移植群、②ドナーのみ CCL8KO マウスの移植群、③ドナー・レシピエントともに CCL8KO マウスの移植群のアウトカムをそれぞれ比較解析した。

結果、レシピエントで CCL8 発現がない①の移植群で著明に生存が改善するだけではなく、ドナー造血細胞の CCL8 発現がない②の移植群でも生存が改善していた。血漿 CCL8 解析結果、ドナー造血細胞に CCL8 発現がない②の移植群においても移植後に血漿 CCL8 産生の増加を認めた。しかし、血漿 CCL8 値の上昇の程度は、①の移植群より縮小していた。



ドナー・レシピエントともに CCL8 の発現がない③の移植群は、当初の予想に反して移植後早期に死亡し、生存率の改善は得られなかった。③の移植群においても、死亡時のサンプリングした骨髄では造血が認められた。



①-③のいずれの移植群においても、野生型同士の移植である対照群と比較して、移植後の体重変化、末梢血白血球数の上昇に有意差はなく、clinical scoreのみレシピエントのみ CCL8 発現がない①の移植群で有意に改善していた。

これらの結果から、CCL8は急性GVHDの病態、特に組織障害に関わる段階に密接に関係していると考えられた。また、CCL8の発現抑制によりGVL/GVT効果を保持したまま急性GVHDの改善が得られる可能性が示唆された。予想に反して、ドナーとレシピエントの両者にCCL8の発現がないと、むしろ生存率が低下することについてはさらなる解析が必要である。今後、急性GVHD標的臓器での移植後臓器障害の程度と急性GVHD所見、CCL8の標的臓器での発現の評価を予定している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 敬太 (IGARASHI, Keita)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70580017

(4) 研究協力者

小海 康夫 (KOKAI, Yasuo)
堀 司 (HORI, Tsukasa)
山本 雅樹 (YAMAMOTO, Masaki)
斉藤 淳人 (SAITOU, Makoto)