

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591131
 研究課題名（和文） インターロイキン 21 のシグナル抑制による GVHD 制御の可能性
 研究課題名（英文） Decoy receptor for IL-21 ameliorates GVHD

研究代表者
 尾崎 勝俊 (OZAKI KATSUTOSHI)
 自治医科大学・医学部・講師
 研究者番号 10286453

研究成果の概要：

これまでの研究成果（平成 17-18 年若手研究 B）から IL-21R を欠損した脾細胞を用いると誘導される GVHD が減弱することが示されている。つまり IL-21 シグナルのない状態では GVHD は引き起こされにくいと考えられたため、GVHD を予防、治療するために IL-21 のデコイ受容体を作成し、骨髄細胞に強制発現させ移植を行った。デコイ受容体は細胞内ドメインの大部分を欠損させたため、リガンドである IL-21 と結合はするものの、シグナルを伝達しない。生理的な IL-21 と結合し、その機能を競合的に抑制することが期待された。実際、*in vitro* の実験ではデコイ受容体は上清中の IL-21 の濃度低下をもたらした。マウスを用いた移植実験では、コントロールベクターを感染させた場合と比較するとデコイ受容体は有意に生存率を上昇させることが明らかとなった。デコイ受容体は IL-21 のシグナルを抑制することで、GVHD を抑制し、生存率を高めたと推察された。このことは IL-21 のシグナルの阻害が GVHD の予防、治療に応用できる可能性を示している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床薬学・血液内科学

キーワード：血液免疫学、免疫制御

1. 研究開始当初の背景

インターロイキン-21は2000年にクローニングされた比較的新しいサイトカインである

(J. Parrish-Novak, Nature, 2000)。インターロイキン-2のファミリーに属し、共通（コモン） γ 鎖を受容体に含む(H. Asao, J Immunol, 2001)。この γ 鎖受容体の遺伝子変異が人

の遺伝病であるX連鎖重症複合免疫不全症の原因である (M. Noguchi, Cell. 1993)。この病気の症状の1つにインターロイキン-21が貢献している可能性が動物実験で示された (K. Ozaki, Science. 2002)。

申請者はこれまでにインターロイキン-21のクローニングを行い (K. Ozaki, PNAS. 2000)、そのノックアウトマウスを作成し、生体内でインターロイキン-21がインターロイキン-4と協調して抗体産生に非常に重要な働きをしていることを明らかにした (K. Ozaki, Science. 2002)。しかしながら生体内でT細胞に対してどのような機能を持つかに関しては、現時点でははっきりしていない。インターロイキン-21と移植片対宿主病との関連は報告されていない。

移植片対宿主病は骨髄移植の合併症の1つで、死亡することもある。その一方で、移植片には対白血病作用があることが知られており、近年増加しているミニ移植はまさにこの移植片対白血病作用を利用して白血病を治そうという治療法である。移植片対宿主病と移植片対白血病作用は臨床的に好ましくないものと好ましいものの組み合わせであり、古くからこの2つを分離して対白血病作用だけを強めよう、もしくは対宿主病だけを弱めようという試みがあるものの、実地臨床では成功していない。

申請者はサイトカインに注目し、サイトカインを制御することにより移植片対宿主病だけを抑制し対白血病作用を保つことが出来るのではないかとの仮説に基づき、平成17年度から科研費若手研究 (B) で研究をスタートさせた。この研究によってインターロイキン-21は移植片対宿主病をプラスの方向に制御し

ていること、インターロイキン-21のシグナルが入らない脾細胞 (インターロイキン-21受容体ノックアウトマウス由来の脾細胞) でも通常通りの移植片対白血病作用を示すことを明らかにした。

この実験結果はインターロイキン-21のシグナルを抑えることが対宿主病の治療になる可能性を示唆している。さらに、ノックアウトマウスの脾臓細胞を用いても対白血病作用が保持されることから、今まで臨床では成功していない、対白血病作用を保ちながら対宿主病を抑制する理想的な治療となる可能性を示唆している。そこで今回申請者は、インターロイキン-21のシグナルを抑制することで移植片対宿主病を治療するモデルを、マウスの系で確立することを計画した。また、移植片対宿主病をインターロイキン-21が増悪させるメカニズムとして、T細胞の増殖を助けるのか、T細胞の分化を助けるのか、また、インターロイキン-21がCD4細胞を介してその効果を発現するのか、CD8細胞を介してその効果を発現するのか、なども同時に調べることを計画した。

2. 研究の目的

今回の研究ではマウスを使った治療モデルの作成を目的としている。これまでの若手研究 (B) の結果から、インターロイキン-21のシグナルを抑えてやれば、移植片対宿主病は抑制されるはずである。何らかの方法でこのシグナルを抑制し、移植片対宿主病の治療に応用できることを示したい。その際に対白血病作用が影響を受けないことが重要である。また、そのメカニズムとして、CD4とCD8どちらが重要なのか、増殖作用と分化作用どちら

を介しているのか、検討したい。

インターロイキン-21 の受容体のノックアウトマウス（申請者が米国 NIH で作成したもの）が材料移転同意書のもと、使用可能であることが特色である。この特色を生かし、インターロイキン-21 の移植片対宿主病、移植片対白血病作用における役割を明らかにすることが出来た。この結果に基づいて今回の申請を計画しており、かなり独創的なものになっていると考える。

これまでの結果からすると、インターロイキン-21 のシグナルを抑制することが出来れば、移植片対宿主病を抑制し、生存曲線を延ばすことが可能となるはずである。これは移植片対宿主病だけを抑制する理想的な治療法となる可能性を秘めている。臨床応用を考える上でこの治療モデルの確立は不可欠であり、非常に大事な研究である。

3. 研究の方法

インターロイキン-21 のデコイ受容体を PCR 法で作製する。この方法を用いると好きな箇所まで蛋白質を終了させ、以下のアミノ酸を欠失させることが出来る。このドミナントネガティブ受容体はリガンドと結合する細胞外ドメインは原型を保つが、シグナルを伝える細胞内ドメインのほとんどを欠失させたもので、リガンドと結合はするもののシグナルを伝えられないため、内在性の生理的な受容体と競合的に働くこととなる。シークエンスしてヌクレオチド配列を確認した後、細胞に強制発現させ、抗体を使って細胞外ドメインが目的通り細胞外に発現していることをフローサイトメーターで確認する。

これをマウスの骨髄細胞にレトロウイルスを用いて強制発現させ、脾細胞の引き起こす

移植片対宿主病を抑制しようという戦略だ。骨髄細胞は移植後様々な血球系に分化し、その数を爆発的に増やす。細胞は末梢血を流れ、全身に供給される。移植片対宿主病の標的臓器は肝臓、皮膚、腸管と言われており、そこにも当然この細胞が到達すると考えられる。また、血中のフリーのインターロイキン-21 の濃度を下げることが予想される。空ベクタ（インターロイキン-21 デコイ受容体が入っていない元のベクタ）を用いた場合と比較することにより、その効果を科学的に比較することができる。デコイ受容体群では空ベクタ群に比較して生存曲線が延び、移植片対宿主病の症状が軽減することが予想される。

また、P815 を用いた移植片対白血病作用の治療モデルは既に平成 17-18 年度の科研費で実験済みであるが、細胞株を使用している点などかなり人工的な面もあるため、これに加えてもう 1 つ自分の骨髄細胞を白血病化させる系を用いたい。BCR-ABL という oncogene をレトロウイルスで骨髄細胞に発現させると、骨髄移植の系で白血病を発症して、死亡するというモデルがある。この系を用いて、移植片対白血病作用を今一度検証したい。再度違う方法で、移植片対宿主病は抑制するものの、対白血病作用はインターロイキン-21 のシグナルがなくても失われないことを確認することにより、より一層高い信憑性が得られることとなる。

4. 研究成果

これまでの研究成果（平成 17-18 年若手研究 B）から IL-21R を欠損した脾細胞を用いると誘導される GVHD が減弱することが示されている。つまり IL-21 シグナルのない状態では GVHD は引き起こされにくいと考え

られたため、GVHDを予防、治療するためにIL-21のデコイ受容体を作成し、骨髄細胞に強制発現させ移植を行った。デコイ受容体は細胞内ドメインの大部分を欠損させたため、リガンドであるIL-21と結合はするものの、シグナルを伝達しない。生理的なIL-21と結合し、その機能を競合的に抑制することが期待された。実際、*in vitro*の実験ではデコイ受容体は上清中のIL-21の濃度低下をもたらした。マウスを用いた移植実験では、当初CD4細胞に感染させ移植していたが、十分な発現を得られなかった。最終的には骨髄細胞に発現させたところ、高効率高発現を得ることができた。移植後2週間目の末梢血を解析したところ、30-70%の細胞がデコイ受容体を発現していた。多数のマウスに移植し、コントロールベクターを感染させた場合と比較するとデコイ受容体は有為に生存率を上昇させることが明らかとなった。デコイ受容体はIL-21のシグナルを抑制することで、GVHDを抑制し、生存率を高めたと推察された。このことはIL-21の阻害がGVHDの予防、治療に応用できる可能性を示している。さらにP815（白血病細胞株）との共移植の系を用いることでGVL効果は温存されるということを示唆した。これらの結果は以前に我々が示したノックアウトマウスの結果とよく合致している(平成17-18年若手研究B)。

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 3件)

1. Oka S, Muroi K, Mori M, Matsuyama T, Fujiwara S, Oh I, Sato K, Kikuchi S, Ueda M, Toshima M, Suzuki T, Ozaki K, Nagai T, Ozawa K, Prediction of response to imatinib in patients with chronic myelogenous leukemia by flow cytometric an

alysis of bone marrow blastic cell phenotypes, Leuk Lymphoma. 査読有. 2009;50(2):290-29

2. Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K, Bortezomib overcomes cell adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma., Oncogene. 査読有. 2008;28(2):231-242

3. Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs)., J Autoimmun. 査読有. 2008 May;30(3):121-127.

[学会発表] (計 2件)

1) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Tatara R, Leonard WJ, Sato K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

2008 Annual Meeting of ASH at San Francisco, CA, 2008年12月7日 (Blood 2008;112(11):453a)

2) Meguro A, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Hatanaka K, Sato K, Tatara R, Suzuki T, Mori M, Nagai T, Muroi K, Ozawa K: Blocking of IL-21 signal attenuates graft-versus-host disease but not graft-versus-leukemia effect in a mouse model.

第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋(0-181, Program p87)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 勝俊 (OZAKI KATSUTOSHI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 10286453

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者