

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790675

研究課題名（和文） マウス骨髄移植モデルにおける間葉系幹細胞の GVHD 制御効果の検討

研究課題名（英文） Treatment of Acute GVHD using MSCs in Mouse BMT Model.

研究代表者

佐藤 一也（SATO KAZUYA）

自治医科大学・医学部・病院助教

研究者番号：60382917

研究成果の概要：

マウス骨髄移植モデルでは、間葉系幹細胞による GVHD の治療効果は確認できなかった。但し、マウス由来間葉系幹細胞は *in vitro* においてはヒトと同様の免疫抑制効果を示しており、何らかの生物学的特性に違いがある可能性が示された。間葉系幹細胞の免疫抑制効果と細胞外マトリックスとの相互関係には非常に興味深いデータが得られたが、エンドトキシンの混入がヒアルロン酸の免疫修飾効果の評価に影響していることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液免疫学、間葉系幹細胞、免疫制御

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植は重症再生不良性貧血や急性白血病などの難治性血液疾患の根治的治療法のひとつとして確立されている。移植成績の向上のためには免疫不全に伴う感染症と急性移植片対宿主病（Graft-versus-Host disease; GVHD）の二大合併症をいかに制御するかが重要である。標準的な GVHD の治療の第一選択薬である副腎皮質ホルモンの奏効率は 30～50% 程度であり、反応しない場合の二年生存率はわずかに 10%程度にすぎない。

近年、間葉系幹細胞が GVHD の治療に有効

であることが報告されており、大きな注目を集めている。間葉系幹細胞の免疫抑制のメカニズムは依然として議論のあるところであるが、現在欧州では前方視的な多施設共同研究試験が実施されており、奏効例が引き続き報告されている。長期的な安全性や病態の解明のためには動物モデルによる *in vivo* での解析が必要であり、本試験ではマウスを用いて間葉系幹細胞による免疫抑制のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究代表者はこれまでマウス間葉系幹細胞の免疫抑制物質としてあらたに一酸化窒素を同定し、報告した（Blood, 2007）。間葉

系幹細胞は容易かつ短期間に大量培養が可能であり、医療経済的に与える恩恵は大きい。また、あらたな細胞移植療法の開拓としても意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究ではマウス骨髄移植モデルを用いて、間葉系幹細胞による GVHD 抑制効果を再現する。前述したように、われわれは間葉系幹細胞の免疫抑制因子のひとつとして一酸化窒素を同定しているが、生体内においても一酸化窒素が間葉系幹細胞の免疫抑制効果を担っているか評価する。マウス骨髄移植モデルでの間葉系幹細胞の GVHD 抑制効果については必ずしも一定の見解は得られていない。間葉系幹細胞の免疫抑制機序を動物モデルで明らかにすることで、効率よく、また安全に間葉系幹細胞が GVHD 治療に臨床応用できる基盤とすることが本研究の主たる目的である。

3. 研究の方法

ドナーに C57/BL6 (H-2b)、レシピエントに同種(H-2b)、BALB/c (H-2d)、及び C3H/Hen を用いたマウス骨髄移植モデルを作成する。骨髄移植前日に放射線照射による前処置を行い、移植には T 細胞を除去した骨髄単核球と脾臓から単利した T 細胞を経静脈的に投与することで GVHD を誘発した。

早期治療群として骨髄移植後より day0, 7, 14 に、後期治療群として day7, 14, 21 に間葉系幹細胞を投与し、生存率と体重の推移を指標として、GVHD の治療効果を比較検討した。免疫抑制因子として一酸化窒素に注目し、一酸化窒素合成酵素 (NOS) ノックアウトマウス由来の間葉系幹細胞を用いて、治療効果を比較検討した。

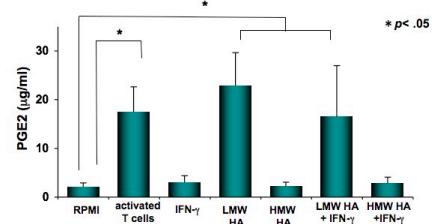
4. 研究成果

研究実施計画に従い、マウス骨髄移植モデルにおいて間葉系幹細胞の細胞数、投与回数、及び投与時期などに工夫を加えて GVHD 抑制効果を検証したが、一定の治療効果は得られなかった。投与したマーキングした間葉系幹細胞を *in vivo* imaging で追跡したところ、殆どが肺にトラップされているなど、ヒトとの解剖学的な違いがあることが一因ではないかと推察している。また、NOS ノックアウトマウスをそれぞれドナー、あるいはレシピエントとした場合の GVHD の重症度においても、野生

型との相違はなかった。一方で、間葉系幹細胞の治療効果が同様のマウスの実験系で確認できたことが2008年にRenらによって報告された (Cell Stem Cell)。更に同グループは生体内においても一酸化窒素が GVHD の制御に中心的な役割を担うことを明らかにした。従って、本研究の目的とするデータが同グループによって報告されたため、追試は行っていない。ほぼ同一の実験系でわれわれが同様の結果を得られなかった原因は明らかではない。

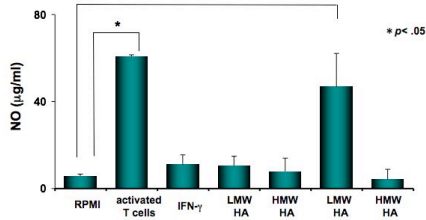
そこで平成19年度以降は基礎データをあらたに蓄積することを目的として *in vitro* での研究をすすめたところ、ヒアルロン酸が間葉系幹細胞の免疫抑制効果に影響している可能性を見いだした。ヒアルロン酸は細胞外マトリックスの主要構成成分の一つであり、高分子では細胞外支持組織としての役割を担うにすぎないが、低分子化することでシグナル伝達に深く関与することが知られている。われわれはマウス骨髄由来の間葉系細胞を用いて、関与する警官細胞がヒアルロン酸合成酵素の一つである HAS-2 を発現しており、恒常的にヒアルロン酸を産生していることを、それぞれ RT-PCR 法、ELISA 法とで明らかにした。一方で活性化 T 細胞にはヒアルロン酸分解酵素である Hyal-2 の発現が誘導されることを確認した。ヒアルロン酸の分子量別で比較すると低分子ヒアルロン酸は単独で間葉系幹細胞からのプロスタグランジン E2 (PGE2) の産生を誘導し、また IFN- γ との組み合わせで一酸化窒素の産生が確認されたが、高分子ヒアルロン酸ではいずれの免疫抑制因子の産生も認められなかった。更に間葉系幹細胞の細胞内シグナルの解析によって、ヒアルロン酸による PGE2、一酸化窒素の産生はそれぞれ異なるシグナル経路で伝達されていることを明らかにした。

LMW HA but not HMW HA produced high amount of PGE2 from MSC



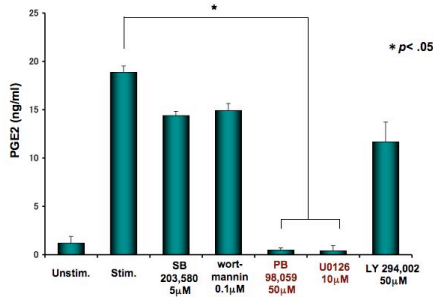
HA biological functions differ depending on the size of HA in MSCs.

LMW HA but not HMW HA produced NO from MSC in the presence of IFN- γ

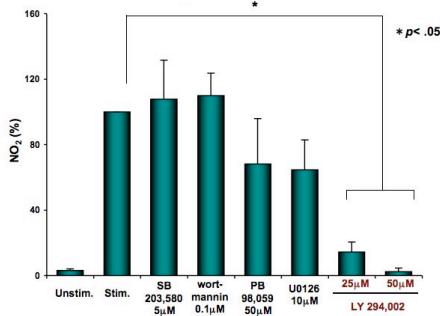


HA biological functions differ depending on the size of HA in MSCs.

PGE2 production

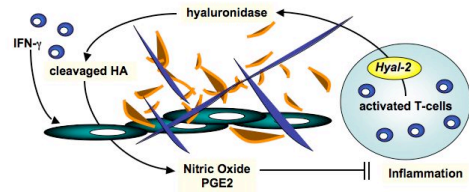


NO2 production



以上から、(1) 間葉系幹細胞は細胞周囲に高濃度のヒアルロン酸を恒常的に発現しており、(2) 炎症の波及 (GVHDなど) によってヒアルロニダーゼ活性を有した活性化T細胞が間葉系幹細胞近傍に存在することで、(3) 低分子化したヒアルロン酸を介して、間葉系幹細胞からPGE2や一酸化窒素などの免疫抑制因子の産生を誘導するとの仮説が考えられた。すなわち、間葉系幹細胞は細胞周囲のヒアルロン酸の分子量の変化によって、制御すべき過剰な免疫反応の変化を認知し、炎症反応を制御している可能性が示唆された。以上の結果は2007年度の米国血液学会の演題に採択され、報告した。われわれの仮説をシエーマに示した。

これまでの仮説



- (1) T-cells expressed mRNA for Hyal-3, and Hyal-2 mRNA became detectable after activation.
- (2) Hyal-2 derived hyaluronidase from activated T-cells cleaves hyaluronic acid into intermediate size fragments of ~20kDa.
- (3) Hyaluronic acid fragments induce PGE2 production in MSCs through CD44 signaling, whereas NO is also produced by cleaved hyaluronic acid only in the presence of IFN- γ .
- (4) NO and PGE2 suppress T-cell proliferation and cytokine production.

しかし、試薬によっては低分子であっても必ずしもPGE2や一酸化窒素の産生を誘導しないヒアルロン酸があることが明らかとなった。試薬を再度検証したところ、一部のヒアルロン酸にエンドトキシンの混入が確認された。われわれはエンドトキシンをリガンドとして、間葉系幹細胞がToll-like receptorを介してPGE2や一酸化窒素の産生を誘導することを報告しており、あらたな知見ではない。

これまでマクロファージなどの免疫担当細胞の活性化にはヒアルロン酸が関与することが数多く報告されているが、いずれもエンドトキシンの混入が誤ったデータの解釈をもたらしている可能性が示唆される。ヒアルロン酸の免疫修飾効果を期待して自己免疫疾患などの治療への臨床応用が検討されているが、本研究の結果から慎重な解釈が必要であることが示された。以上のデータは論文発表を予定している。

ヒト臍帯由来のヒアルロン酸のおけるコンタミネーションの可能性

販売会社	ヒアルロン酸の起源	分子量	エンドトキシン		MSCにおけるNO産生
			1回目	2回目	
R&D①	Streptococcus	4.7kDa	0.8以下	ND	なし
R&D②	Streptococcus	33kDa	0.8以下	ND	なし
R&D③	Streptococcus	132kDa	0.8以下	ND	なし
R&D④	Streptococcus	980kDa	0.8以下	ND	なし
Wako HA①	Streptococcus	>1000kDa	0.8以下	ND	なし
Wako HA②	Rooster comb	>1000kDa	0.8以下	ND	なし
Calbiochem	Human umbilical cord	680kDa	967	1660	あり
Calbiochem	Streptococcus	750kDa	0.8以下	1	なし
Sigma	Human umbilical cord	750kDa	538	314	あり
PG/サーチ	Streptococcus	100-300kDa	0.8以下	ND	なし
PG/サーチ	Streptococcus	600-900kDa	0.8以下	ND	なし

- ヒアルロニダーゼ、4-MU、及びBPGといった既知のヒアルロン酸の阻害剤での実験が上手くいかない。
- 免疫抑制効果を及ぼすヒアルロン酸の分子量が同定できない。

自治医科大学附属病院血液科においては、倫理委員会の承認を経て臨床研究「造血幹細胞移植後に発症した難治性急性GVHDに対する血縁者由来間葉系幹細胞を用いた治療(平成20年4月25日承認)」が実施されており、本研究結果は、より効率的で安全性の高い臨床的

な間葉系幹細胞の条件設定を行うことを副次的な目的としてきた（本研究計画書に記載）。しかし、マウスとヒト間葉系幹細胞では細胞の増殖速度や表面抗原マーカーはもとより、分泌される免疫抑制因子も少なくとも一部で明らかに異なっていることが確認できた。ヒトでは70%以上のGVHDの治療効果が実証されている一方で、本研究でのマウス骨髄移植モデルで証明できなかったことは、引いては細胞レベルでの免疫抑制のメカニズムの差違によるものかは今後の検討が必要である。引き続き臨床研究と基礎データの発展により、安全性が高く、より効果的な治療戦略が確立できるように研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計3件）

- ① 佐藤 一也、尾崎 勝俊、間葉系幹細胞によるGVHD制御、血液・腫瘍科、58巻、371-375、2009、査読なし
- ② 佐藤 一也、尾崎 勝俊、間葉系幹細胞によるGVHD治療の現状、Annual Review、36-41、2008、査読なし
- ③ Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami, and Kume A, Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs)., J Autoimmun. 2008 May;30(3):121-127. 査読あり

〔学会発表〕（計1件）

- ① Sato K, Ozaki K, Oh I, Matsu H, Tatara R, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, and Ozawa K., Hyaluronidase and IFN- γ from Activated T-Cells Are Key Mediators To Induce Immunosuppressive Activity of Mesenchymal Stem Cells. 49th ASH Annual Meeting and Exposition, Dec 10, 2007. Georgia
(Blood, Nov 2007; 110: 3246.)

〔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〕

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 一也 (SATO KAZUYA)

自治医科大学・医学部・病院助教

研究者番号：60382917