

機関番号：12602
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591246
 研究課題名（和文） 治療抵抗性GVHDの機序解明と治療法の探索
 研究課題名（英文） Mechanism of therapy-resistant GVHD and its treatment strategy
 研究代表者
 長澤 正之（NAGASAWA MASAYUKI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員
 研究者番号：90262196

研究成果の概要（和文）：

Jun kinase (Jnk)はT細胞の活性化・増殖、IL2産生に關与する重要なキナーゼである。増殖期T細胞では抗CD3+抗CD28抗体刺激によるJnk活性化が休止期T細胞に比べ亢進していた。その活性化にはMEKK2が重要であるとともに、MKK4の活性化(リン酸化)が關与していることが示唆された。休止期T細胞と異なり、活性化T細胞におけるJnk活性化の抑制にはカルシニューリン阻害剤では不十分であり、これが治療抵抗性GVHDの原因の一つであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Jun kinase (Jnk) is an important kinase that is involved in T cell activation, proliferation and IL-2 production. We have found that Jnk activation by anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation is enhanced in activated T cells compared to resting T cells. Although MEKK2 is important in Jnk activation, phosphorylated MKK4 in activated T cells, which is not found in resting T cells seems to be involved in enhanced Jnk activation. Jnk activation in activated T cells is not inhibited enough by calcineurin inhibitor, and this may explain some part of therapy-resistant GVHD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：GVHD, Jun kinase, MEKK2, 活性化T細胞、JurkatT細胞、カルシニューリン阻害剤

1 【研究当初の背景】

造血幹細胞移植は白血病や先天性免疫不全症をはじめとする遺伝子異常症の根治的治

療法として現代医療の中で重要な役割を担っている。シクロスポリンやタクロリムスなどのカルシニューリン阻害剤の開発により

以前に比べ移植片宿主反応 (GVHD) のコントロールが容易になり、治療成績も改善されてきているが、非血縁者間移植症例の増加に伴い、依然 GVHD が最大の合併症として立ちまわっている。一方、過度な免疫抑制は白血病再発を増やし、日和見感染症のリスクを上げることにつながる。われわれの施設では今まで 100 例以上の同種造血幹細胞移植を施行してきたが、その臨床経過について免疫抑制剤の使用法などを詳細に検討した結果、いくつかの例で標準的に使用される免疫抑制剤であるシクロスポリン、タクロリムスやステロイドに抵抗性を示す GVHD が存在することが示された。このような難治性 GVHD に対するあらたな治療戦略の必要性が求められている。

2 【研究の目的】

難治性 GVHD は既に活性化された T 細胞の制御が上手いことによると考えられる。しかし、従来の免疫抑制の過度な強化は白血病の再発、日和見感染の危険性を増す可能性がある。活性化 T 細胞に特異的な活性化機序がわかれば、通常の免疫機能への影響を少なくして GVHD 治療を行うことが可能になるかもしれない。以上の背景を踏まえ、IL-2 産生調節や細胞増殖/死に重要な役割を果たすといわれている Jnk(jun kinase)活性化機序を活性化 T 細胞モデルで検討を加えた。

3 【研究の方法】

解析対象とする細胞は末梢血 T 細胞および JurkatT 細胞株を用いた。末梢血 T 細胞はヒトヘパリン加血より E ロゼット法にて CD3 >95% として用いた。T 細胞刺激として PDB, ionomycin, 抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体を用いた。遺伝子導入実験はリン酸カルシウム法を用いた。

Jnk 活性測定は GST-c Jun 蛋白を基質とし、³²P を用いた in vitro kinase 測定法でおこなった。細胞増殖は ³H-チミジン取り込み法を用いた。

恒常的遺伝子導入細胞株の作成については、neo 耐性遺伝子による選択半固層化培地を用いて樹立・クローニングを行った。

AP-1, NFAT, NFkB, IL2 転写因子活性については各々の転写調節領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子に組み込み、ルシフェラーゼ活性測定法にて行った。

4 【結果】

<活性化 T 細胞における Jnk 活性化の亢進>
末梢血 T リンパ球を抗 CD3+抗 CD28 抗体で刺激したところ Jnk 活性化は不十分であっ

たが、PDB+ionomycin 刺激では十分な活性化が誘導された。PDB+ionomycin 刺激による Jnk 活性化は 2 時間をピークに 12 時間後には未刺激レベルに低下した。一方、PDB+ionomycin で一度活性化し増殖期 (36 時間以降) に入った末梢血活性化 T 細胞を抗 CD3+抗 CD28 抗体で刺激したところ Jnk の十分な活性化が認められた。活性化した後、12、16、18、24 時間後にそれぞれ抗 CD3+抗 CD28 抗体で刺激したところ時間とともに Jnk 活性は増大した。(図 1-a,b,c)

JurkatT 細胞株では、抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激、PDB+ionomycin 刺激ともに十分な Jnk 活性化が認められ、活性化 T 細胞のモデル細胞と考えられ、以降活性化 T 細胞における Jnk 活性化機序の解析検討に用いた。

図 1-a

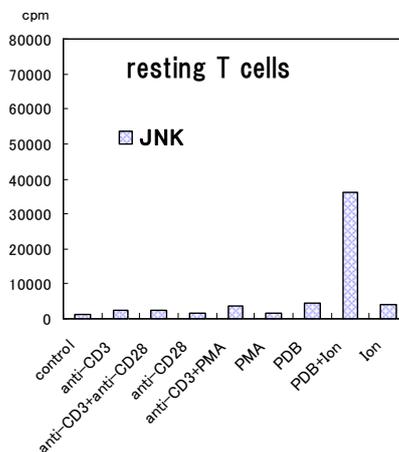


図 1-b

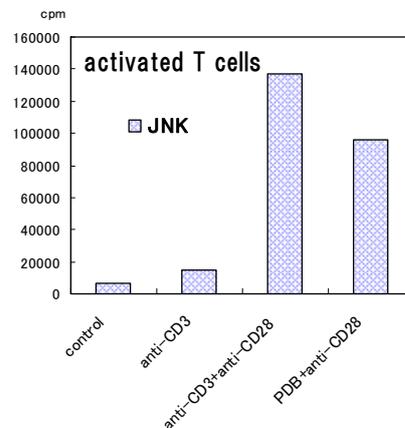


図 1-c

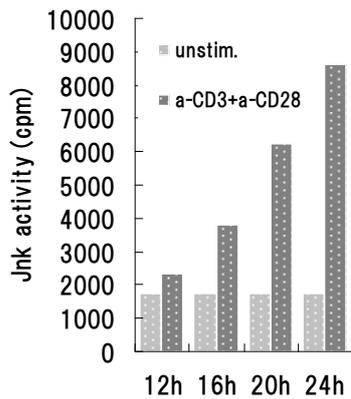
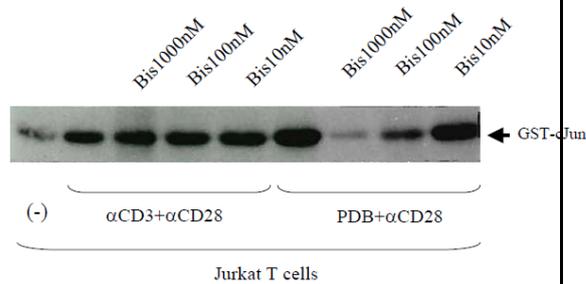


図 2



<PKC の役割> (図 2)

末梢血活性化 T 細胞および JurkatT 細胞株とも PDB+ionomycin 刺激による Jnk 活性化は PKC 阻害剤により抑制されたが、抗 CD3+抗 CD28 抗体による Jnk 活性化は抑制しなかった。PKC 阻害剤により MAP kinase は両者とも抑制された。

<MEKK2 の役割> (図 3-a,b,c)

Jnk 活性化の上位キナーゼになにが重要なのかを検討するため、MEKKs の影響について検討した。AP-1 は Fos と Jnk により活性化された jun のダイマーにより構成されるが、まず、予備検討として Jnk 活性化と AP-1 活性化が相関することを確認した。次に AP-1 ルシフェラーゼ活性を指標に検討した。抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による JurkatT 細胞の AP-1 活性化が野生型 MEKK2 導入により増加し、優勢抑制変異型 MEKK2 導入により抑制されたことから、Jnk 活性化には MEKK2 が重要であることが示された。JurkatT 細胞に dominant negative MEKK2 を高発現させた細胞株を作成し検討したところ、PDB+ionomycin、抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による Jnk 活性化および IL2 転写活性が有意に抑制されていた。

図 3-a

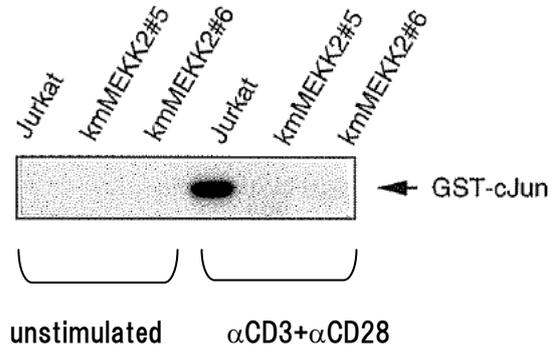


図 3-b

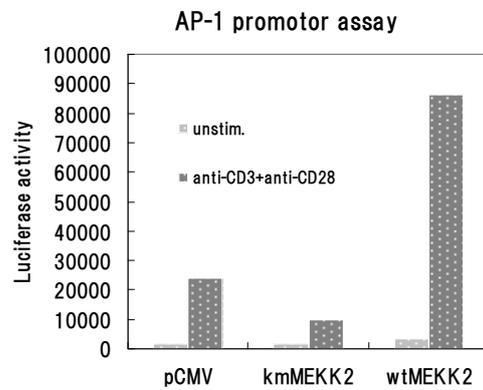
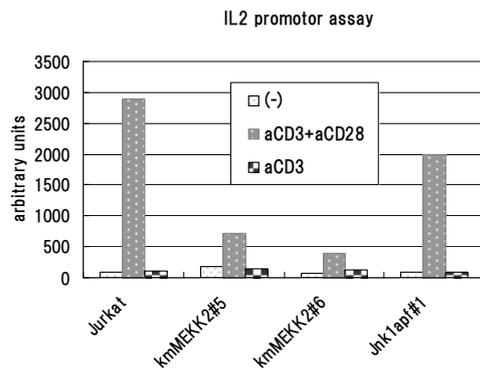


図 3-c

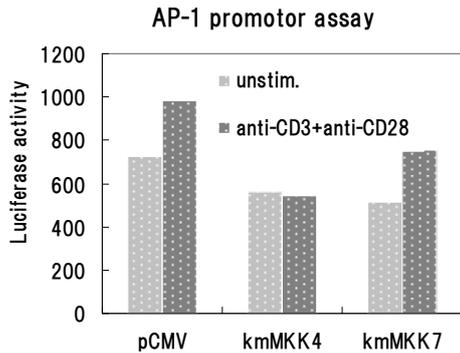


<MKK4 の役割> (図 4-a,b)

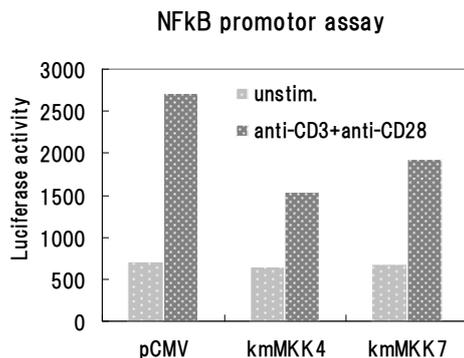
休止期末梢血 T 細胞の Jnk 活性化には MKK7 が重要であるとされている。抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による JurkatT 細胞の AP-1 活性化に対する MKK4, MKK7 の影響をそれぞれの優勢抑制変異型遺伝子導入によって調べたところ、dominant negative MKK4 により AP-1 活性が抑制された。

一方、休止期末梢血 T 細胞と活性化 T 細胞で MKK4 の発現とリン酸化型（活性化型）MKK4 を検討したところ、MKK4 の発現には差は認められなかったが、休止期 T 細胞ではリン酸化型 MKK4 が認められなかったのに対して、活性化 T 細胞ではリン酸化 MKK4 が認められた。活性化 T 細胞における Jnk 活性化の亢進は MKK4 のリン酸化による可能性が強く示唆された。

(図 4-a)

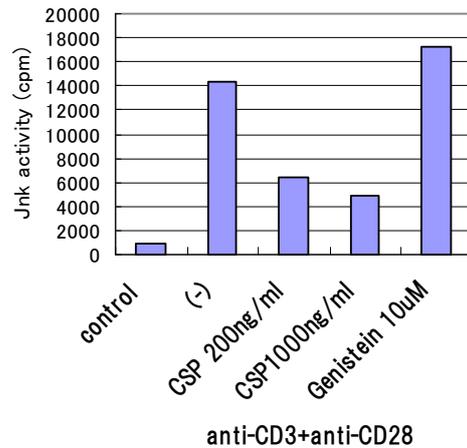


(図 4-b)



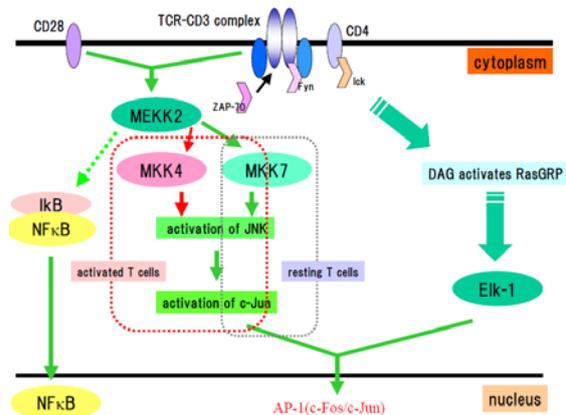
<シクロスポリンの作用とその限界> (図 5)
シクロスポリン (CSP) はカルシニューリン阻害により IL2 転写調節因子である NFAT を抑制することにより免疫抑制活性を發揮する。しかし、Jnk 活性化を抑制する作用が新たに報告されている。
抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による Jurkat T 細胞の NFAT 活性は CSP200ng/ml で >90% 抑制されたが、Jnk 活性は殆ど影響を受けず、CSP1000ng/ml でも 40-50% の抑制効果しか見られなかった。
以上から活性化 T 細胞の制御に関しては治療域の CSP 濃度では不十分であることがシグナル伝達の上からも確認された。

(図 5)



<活性化 T 細胞における Jnk 活性化モデル>
休止期 T 細胞と異なり、活性化 T 細胞では MKK4 の活性化による経路が賦活化されていることで Jnk 活性化亢進になっていると考えられる。

(図 6)



5 【主な発表論文など】

[雑誌論文] (計9件)

① **Masayuki Nagasawa**, Zhu Yi, Shinsaku Imashuku, Shigeaki Nonoyama, Kazuyuki Ogawa, Ko Okumura, Shuki Mizutani Soluble TWEAK is markedly elevated in hemophagocytic lymphohistiocytosis *American Journal of Hematology* 2008, 83:222-225

② Emiko Sato, Shoichi Oga, Hiroshi Kuroda, Fumiaki Yoshida, Miki Nishimura, **Masayuki Nagasawa**, Masami Inoue and Keisei Kawa. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Epstein-Barr virus-associated T/ natural killer-cell lymphoproliferative disease

in Japan. *American Journal of Hematology* 2008, 83: 721-727

③Yoko Katsuki, Shinichiro Nakada, Tetsuji Yokoyama, Issei Imoto, Johji Inazawa, **Masayuki Nagasawa** and Shuki Mizutani. Caffeine yields aneuploidy through asymmetrical cell division caused by misalignment of chromosomes. *Cancer Science* 2008, 99: 1539-1545

④Minegishi Y, Saito M, **Nagasawa M**, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Karasuyama H. Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 ; 206(6):1291-301.

⑤**Masayuki Nagasawa**, Ogawa K, Nagata K, Shimizu N. Serum granulysin as a possible biomarker of natural killer cell neoplasm. *British Journal of Haematology* 2010, 148: 812-814

⑥ **Masayuki Nagasawa**, Noriko Mitsuiki, Toshiaki Ono, Masatoshi Takagi, Hiromi Oda, Masato Yasuhara, Shuki Mizutani Pharmacokinetic monitoring is still required for intravenous busulfan in SCT for small children *International Journal of Hematology* 2010, 91:728-730

⑦Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, **Nagasawa M**, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation *Blood* 2011, 117 (10) :2887-2890

⑧Masako Saito, **Masayuki Nagasawa**, Hidetoshi Takada, Toshiro Hara, Shigeru Tsuchiya, Kazunaga Agematsu, Masafumi Yamada, Nobuaki Kawamura, Tadashi Ariga, Ikuya Tsuge, Shigeaki Nonoyama, Hajime Karasuyama and Yoshiyuki Minegishi Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2011: 208(2); 235-249

⑨長澤正之 「細胞傷害性蛋白グラニューライシンの機能とその測定の臨床的意義につい

て」日本小児血液学会雑誌 2010、24 ; 195-203

[学会発表] (計 8 件)

①長澤 正之
「当科における移植関連 TMA の臨床経験」
シンポジウム「移植合併症の問題点」
2009年11月27日. 第51回日本小児血液学会 東京ベイホテル東急 (千葉)

②長澤 正之
「誘電分光法によるカルシニューリン阻害剤投与患者の赤血球解析」
2009年11月27日. 第51回日本小児血液学会 東京ベイホテル東急 (千葉)

③長澤 正之
「小児造血幹細胞移植における免疫抑制剤の標準化・適切化に関する研究」
2009年11月29日. 第51回日本小児血液学会 東京ベイホテル東急 (千葉)

④長澤 正之
「当科における同種造血幹細胞移植 (1995-2007年) の検討」
2009年4月19日 第112回日本小児科学会 学術集会 奈良県文化会館 (奈良)

⑤長澤 正之、永田 欽也、小川 一行
「血清 granulysin 測定の臨床的意義について」
2010年4月23日 第113回 日本小児科学会学術集会 (於: 盛岡)

⑥長澤正之、大川哲平、遠藤明史、満生紀子、青木由貴、小野敏明、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀
「造血幹細胞移植における新規「DIC・微小血管障害の臨床スコア」作成とその有効性・有用性の後方視的検討」
2010年12月18日 第52回日本小児血液学会 (大阪国際会議場)

⑦長澤正之、早川智広、林 義人、大森真二
「誘電分光法による造血幹細胞移植患者赤血球の細胞誘電測定」
2011年3月9日 第33回日本造血幹細胞移植学会 (愛媛: 松山)

⑧長澤正之、大川哲平、遠藤明史、満生紀子、青木由貴、小野敏明、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子*、森尾友宏、水谷修紀
「造血幹細胞移植における凝固異常とその

予後の解析-その対策に向けての提案-
2011年3月10日 第33回日本造血幹
細胞移植学会（愛媛：松山）

[図書]（計2件）

長澤正之（分担執筆）「今日の診断指針」第6
版「小児の脳腫瘍」医学書院 pp1848-1850
（2010年）

長澤 正之（分担執筆）
「2011-2012EBM 小児疾患の治療」五十嵐
隆 編 「免疫不全症への RIC の有効性？」
pp498-504 中外医学社 2011

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ

http://aqua.tmd.ac.jp/ResDB/DispRsch/dsp_resdata.php?id=288&la=ja

【研究組織】

(1) 研究代表者
（ 長澤 正之 ）

研究者番号：90262196