

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890031

研究課題名（和文）

移植片対宿主病における Notch シグナルが担う免疫調節機構の解明

研究課題名（英文）

The immunoregulation of Notch signaling in graft versus host disease.

研究代表者

錦井 秀和 (NISHIKII HIDEKAZU)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：30512834

研究成果の概要（和文）：

移植片対宿主病における Notch シグナルが担う免疫調節機構を明らかにするために、同種異型マウス間の骨髄移植系を確立した。移植時の免疫反応において主要な役割を担う T 細胞での Notch シグナルの修飾を行うために、まず FACS（蛍光抗体標識）法・MACS（磁気ビーズ）法を用いた造血幹細胞・T 細胞の純化と単離を行った。また高力価レトロウイルスを作成して T 細胞における Notch シグナルの修飾を行った。

研究成果の概要（英文）：

To clarify how Notch signal works on the immunoregulation system in the graft versus host disease (GVHD), we established the mouse-GVHD model using bone marrow transplant. We also established the purification system of hematopoietic progenitor cells derived from bone marrow and T cells derived from spleen using FACS sorting and MACS. Then, we modified T cell signaling by high-titered retrovirus system.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2008 年度 | 1,340,000 | 402,000 | 1,742,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 総計 | 2,540,000 | 762,000 | 3,302,000 |

研究分野：血液内科学

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：Notchシグナル 移植片対宿主病

1. 研究開始当初の背景

本研究の主題は、同種造血幹細胞移植時の移植片対宿主病（graft versus host disease, GVHD）と移植片対腫瘍効果（graft versus tumor, GVT）における免疫調節機構の分子メカニズムを明らかにする事で、抗腫瘍効果を落とさずに致死的な移植片対宿主病を回避する為の新規治療法の開発を目指した基礎研究計画である。

同種造血幹細胞移植は、現在確立している唯一の幹細胞療法であり、また、造血器腫瘍に対する最も強力な治療法であるが、同種免疫反応による移植片対宿主病が重症化すると、致死的な経過を辿ってしまう事が避けられない。一方で、この反応が同種免疫による抗腫瘍効果すなわち移植片対腫瘍効果を示すことも明らかとなっており、これらの免疫調節機構を明らかとし、移植時の同種免疫反応において移植片対宿主病を最小限に抑えつ

つ抗腫瘍化効果を保つ方法論の必要性が高まっている。特にHLA適合ドナーが得られない場合には、致死移植物対宿主病の回避のためにT細胞除去を行なうことで、HLA 2 座以上不一致血縁者からの造血幹細胞移植が可能であることが臨床的にも示されているが(Transplantation 79:1351-1357, 2005)、致死移植物対宿主病を回避できる一方でT細胞系を中心とした免疫再構築の遅延の為、重症感染症、腫瘍再発の頻度が上昇してしまう事が問題点として挙げられている。

一方、Notchシグナルは古くから細胞分化を決定するシグナルとして知られており、免疫系を構築する細胞においても、T細胞が造血幹細胞から分化する過程でNotch1シグナルが必須である事が明らかとなっている(Nature Immunology 6:314-322, 2005)。また、抗原刺激によりCD4陽性T細胞のNotch分子のmRNAの発現は増加する事が知られている事、CD4陽性T細胞のTh分化・制御性T細胞(Treg)分化にも関わるという報告から、NotchシグナルがT細胞分化の各段階において役割を担っていると考えられているが、実験システムにより結論の違いがあり、その生理的な役割は未だ明らかとなっていない。

最近、Notch-1のリガンドであるDelta-like-1を発現するマウス間質細胞、OP9-DL-1細胞上でマウス造血幹細胞を培養する事で効率よくT細胞前駆細胞を分化誘導する事が可能であり、これらの細胞とT細胞を除去した造血幹細胞を非致死量の放射線を照射した同種異型のレシピエントマウスに移植すると、増幅されたT細胞前駆細胞がレシピエントの胸腺で教育を受けることにより、①速やかなT細胞系のキメリズムの改善、②細菌感染への抵抗性の改善、③移植片腫瘍効果の保持、④移植片対宿主病の軽減化を観察できることが発表された(Nature Medicine 12:1039-1047, 2006)。この発表は、表裏一体であると考えられていた移植片対宿主病と移植片対腫瘍効果を分離して、特異的な抗腫瘍効果を期待する事ができるという意味で画期的な発表であった。また一方で、CD4及びCD8陽性T細胞の成熟、活性化制御にもNotchシグナルが関与しているという報告が多数あり、応募者の所属する研究施設でも、Notch2が特にC

D8陽性T細胞の活性化に必須である事を示唆する結果を得ている(未発表データ)。この事から移植片対宿主病における免疫調節においてNotchシグナルが重要な役割を果たしている可能性が高く、このシグナルカスケードが致死移植物対宿主病における分子標的となる可能性が高い。

本研究の研究代表者は前所属研究室で、造血幹細胞移植時における重篤な合併症の一つである血小板減少症に対する対策として、メタロプロテイナーゼ活性の血小板造血及び血小板寿命における制御機構に関する研究を行なってきた。その一環としてマウス造血幹細胞移植実験を行なう過程において、より根本的な命題として造血幹細胞移植時の同種免疫反応の調節機構に着目した。臨床上問題となるような重症移植片対宿主病における新規治療法の開発につながると考えられ、学問的な貢献のみならずトランスレーショナルリサーチへ向けた基礎研究としての意義も深いと考えられる。

このような背景から、同種免疫反応の主要な役割を担うT細胞分化・機能に必須であると考えられているNotchシグナルに焦点を当て、本研究を計画するにいった。

2. 研究の目的

Notchシグナルは神経・血液系を始めとした様々な細胞において、未分化細胞の分化運命を決定するシグナルとして知られており、免疫系を構築する細胞においても、B細胞またはT細胞が造血幹細胞から分化する過程でNotchシグナルが必須である事が明らかとなっている。特に、抗原刺激によりCD4陽性T細胞のNotch分子のmRNAの発現は増加する事が知られている事、CD4陽性T細胞のTh分化・制御性T細胞(Treg)分化にも関わるという報告から、NotchシグナルがT細胞分化の各段階において役割を担っていると考えられ、免疫疾患の治療標的になりうる可能性が報告されているが、実験システムにより結論の違いがあり、その生理的な役割は明らかになっておらず、実用化にもいたっていないのが現状である。特に、今回実験目的とした、致死移植物対宿主病においてはNotchシグナルがどのような役割を果たしているかは不明であり、発展が期待される分野である。

一方、臨床現場では移植片対宿主病のような同種抗原に対する激しい免疫応答をコン

トロールしなければならない場面にしばしば遭遇するにも関わらず、現時点ではその分子メカニズムの基礎データが希薄であるが故に、その治療法は、分子標的的なアプローチではなく、広範な免疫抑制作用を持つ副腎皮質ホルモンや、カルシニューリン阻害薬が中心となっている。しかし正常免疫反応に対する抑制作用も同時に認めることから、晩期感染症などの合併症に苦しみ、結果として重症の移植片対宿主病を発症した患者は、移植により現疾患の加療に成功しても救命できない事がしばしばである。

本研究では現時点で最も臨床現場で行なわれる同種骨髄幹細胞移植に近い実験動物モデルである同種異型マウスの造血幹細胞移植モデルを用い、更にドナーにN o t c h 2 ノックアウトマウスを用いることで、より生理条件下に近い状態での移植片対宿主病または移植片対腫瘍効果に対するN o t c h シグナルの役割を明らかにし、重症移植片対宿主病における新規治療法の開発の可能性を探求する事を最終目的と設定した。

副次目的として、移植片対宿主病と表裏一体の関係となっていると考えられている移植片対腫瘍効果に対する影響を解析する事を計画した。移植片対腫瘍効果はHLAが完全に一致している一卵性双生児間の移植成績が、通常の間同胞間の移植と比べ原病の再発が多いという現象が見られる事から注目され、様々な解析の結果、同種免疫反応がレシピエント内に僅かに残存する腫瘍細胞に対する細胞障害性を発揮し、抗腫瘍効果を認めることが分かってきた。理論的には抗腫瘍特異的同種免疫反応だけを維持できて、他の同種免疫反応を抑制することができれば、致死的な移植片対宿主病を回避しつつ、十分な抗腫瘍効果を期待することが可能である。

逆に過剰に且つ広範に同種免疫反応を抑制すれば、致死的な移植片対宿主病は回避できるものの一方で移植片対腫瘍効果も抑制される懸念もあり、これらの免疫反応の綿密なコントロールが肝要であると考えられ、N o t c h シグナルが移植片対宿主病の発症に関連があるとすれば、抗腫瘍効果に対する影響の解析も必須であると考えられる。

そこで、担癌マウスをあらかじめ作成した上でそれをレシピエントマウスとしたマウス同種異型移植を行い、その抗腫瘍効果を観察しさらにN o t c h シグナルの修飾を行った際にどのような影響を及ぼすかを評価する。

3. 研究の方法

同種異型マウス造血幹細胞移植モデルの作製

本研究では、第一に臨床現場で遭遇する移植片対宿主病または移植片対腫瘍効果に近い同種異型マウス造血幹細胞移植モデルを作製し、移植片対宿主病の重症度または、抗腫瘍効果を鋭敏に検出する方法を樹立する事が肝要となる。マウスにおける移植拒絶反応には主要組織遺伝子複合体分子(MHC分子)である主要組織抗原とマイナー組織抗原が関与する。主要組織抗原及びマイナー組織抗原が異なる移植では急性の移植片対宿主病を発症し、移植後早期(移植後5日から10日)に運動能力の低下・体重減少・下痢を認めるようになり、移植後10から20日までに全例死亡する。マイナー組織抗原のみ異なる移植では、慢性の移植片対宿主病を発症する。これらの症状をスコア化し定量化する事により重症度判定を行なう。

具体的には、致死量放射線を照射したBALB/Cマウス(MHC:H2^d)をレシピエントとし、ドナーにC57BL/6マウス(MHC:H2^b)の大腿骨または頸骨から採取した骨髄細胞または、採取した骨髄細胞中のT細胞を抗CD3、CD4、CD8またはThy1.2抗体を用いて磁気ビーズを用いて除去する事(MACS)によって作成したT細胞除去した骨髄細胞または、フローサイトメトリーを利用したセルソーティングにより、高度に純化した造血幹細胞であるCD34陰性c-Ki t陽性Sca-1陽性Lin陰性細胞を尾静脈より移植する系を構築する。この同種異型移植系では主要組織抗原が異なる系である為に、急性GVHDが引き起こされマウスは死亡する系であるが、同種免疫の主体を担うT細胞が除去されることにより、急性GVHDの程度は軽減され観察期間は延長する。ここにマウス脾臓から採取したT細胞または、試験管内で造血支持細胞として数々の報告があるOP9細胞にN o t c h のリガンドの一つであるd e l t a 1が恒常的に発現し、N o t c h シグナルの増強作用を持つと報告されているストロマ細胞であるOP9-d e l t a 1細胞と共培養する事によって増幅させたT細胞前駆細胞をさらに投与する。T細胞投与群は急性GVHDを発症するが、T細胞前駆細胞投与群では投与されたT細胞前駆細胞がレシピエントの胸腺内で教育を受け宿主に対する免疫寛容が成立し、移植片対宿主病を仲介し得ない為、マウスは生存が可能であるが期待される。

この系においてドナー細胞と投与したT細胞

胞をレシピエント中で区別する為に、移植細胞系には、Ly5コンジェニックマウスの系を用いる（例；ドナー骨髄細胞；Ly5. 2、T細胞またはT前駆細胞：Ly5. 1）。これにより、移植後のT細胞系の再構築の過程をFACS解析によりリアルタイムで観察する事が可能であり、これらの細胞のサイトカイン産生能も二重染色にてモニタリングが可能である（Nature Medicine 12:1039-1047, 2006）。また、同時にマウス悪性腫瘍細胞である、B6RV2、Lewis肺癌、B16、S129細胞を皮下へ移植し、腫瘍径の計時的計測または、移植後に腫瘍を摘出し病理学的変化を観察する事により、移植片対腫瘍効果を観察するモデルを構築する。

Notch2を欠損したT細胞の投与による移植片対宿主病への影響

先に述べた移植系でNotch2コンディショナルノックアウトマウスを用い、Notch2が欠損したT細胞を同時に尾静脈より移植する事によりNotchシグナルの移植片対宿主病における機能を解析する。

Delta1の刺激によるNotchシグナルの活性化が細胞障害性T細胞（CTL）への分化を誘導する事から、**移植細胞でNotch2が欠損する事で、重症移植片対宿主病の発症が予防できる事が予想される**。同時に投与するT細胞をA：CD4及びCD8陽性T細胞全てにおいてNotch2コンディショナルノックアウトマウス由来のNotch2が欠損したT細胞である場合、B：CD4陽性細胞のみがNotch2が欠損し、CD8陽性細胞は正常マウスから得たものを投与する場合、C：CD8陽性細胞のみNotch2が欠損し、CD4陽性細胞は正常マウスから得たものを投与する場合、D：投与するT細胞が全て正常マウスから得たものである場合、これら4群を比較する事により、同種免疫におけるNotch2の役割を明確にする。また前臨床試験として、Notch阻害薬であるγ-セクレターゼ阻害薬を投与する事で、重症移植片対宿主病を回避する事が可能であるかどうか確認を行う。これらの効果判定は体重減少を始めとした移植片対宿主病の重症度スコア判定によって行う。

また、Notchシグナルがどのような転写因子・シグナル経路を動かして、T細胞分化に関わるのかは未だ不明な点が多く、移植

片対宿主病におけるNotchシグナルの下流分子の同定も試みる。

具体的には現在T細胞分化においてNotchシグナルの下流に存在する分子と考えられているHESファミリー分子であるHES1-5、Hey1遺伝子を抗力価レトロウイルスを用いて強制発現したものまたは、ドミナントネガティブ変異体を導入しNotchシグナル伝達が阻害されたT細胞を移植する事により、移植片対宿主病におけるNotchシグナルの役割を明確にし、致死性の移植片対宿主病における分子標的の候補遺伝子を同定することを試みる。

Notchシグナルの刺激を利用した抗腫瘍特異的細胞障害性免疫の獲得

本研究の目的は、致死的な重症移植片対宿主病を回避し、効果的な移植片対腫瘍効果をNotchシグナルの修飾により達成する事にある。そこで、抗腫瘍効果の修飾という観点で以下の実験を行う。マウス腫瘍細胞であるB6RV2、Lewis肺癌、B16、S129細胞を皮下へ移植した担癌マウスモデルに対して、OP9-Delta1細胞によりNotchシグナルを刺激した同種異型マウス由来T細胞投与による抗腫瘍効果を判定する。この際のNotchシグナルの役割を明らかにする為に、投与するT細胞の一部を前述した4群に分けて投与を行った後、同時に起きると予想される移植片対宿主病の重症度と腫瘍径の変化を経時的にモニタリングを行う。

これらの実験結果で、抗腫瘍効果と移植片対宿主病の重症度に解離が見られる場合、同種異型マウスモデルにおける抗腫瘍効果特異的な同種免疫の分離が可能である事が示される。明らかな差異を認めない場合、レンチウイルスを用いたsiRNAの導入により、他のNotch関連分子の修飾を試みる。

4. 研究成果

平成21年度はマウス同種移植系におけるドナーT細胞におけるNotchシグナルの機能解析を行う為に、生体マウスからの骨髓及び脾臓から造血幹細胞・T細胞の効率的分離法・T細胞への遺伝子導入法を確立した。

成体マウスを安楽的に死亡させ骨髓・脾臓細胞を採取した後、FACS法（BD社、FACS Ariaを使用）またはMACS法による単離を行った。条件検討の結果、T細胞を除去した造血前駆細胞の単離にはFACSを用い、T細胞単離にはMACSを用いる事で、効率的な採取が可能であることが明らかとなった。また、造血前駆細胞の単離には当初は、Lineage抗体（成熟好中球、リンパ球、赤血球に対する特異的抗体を混和したもの）を用いてMACS法でネガティブセレクションを行った後、FACSソーティングを行う方法で行っていたが、単離に時間がかかるのが問題であった。そこで、造血幹細胞の未分化性維持に必須であるSCFのレセプターであり且つ未熟細胞のマーカーでもあるc-Kitに対するMACSビーズを用いて、ポジティブセレクションにより造血前駆細胞を効率的に純化した後、必要に応じてFACSソーティングを行う方針とした。

次に移植用T細胞に遺伝子修飾を行う為にレトロウイルスを用いた効率的遺伝子導入システムを構築した。まずNotchシグナルの下流にありリンパ球分化に必須の役割を担う事が既に報告されているHES1遺伝子の強制発現系の確立を行った。ヒト正常細胞からクローニングしたHES1遺伝子をレトロウイルスベクター（小野寺雅史博士より供与）に導入し、293gp細胞にエンベロップ蛋白発現プラスミド（PCDNA-VSVG）と共に磷酸カルシウム法で遺伝子導入した後、超遠心法により、濃縮高力価レトロウイルスを作成するシステムを確立した。

また、発現効率を向上させる為の塩基配列修飾を行い（コドン最適化法、Genscript社に依頼）更に効率的に遺伝子導入を可能となるよう塩基配列を修飾した構築も作成し、発現効率を解析中である。このウイルスを用いて単離したT細胞へHES1またはドミナントネガティブ型のHES1の変異体を導入しT細胞の機能解析を進めている。現在移植実験系の構築中であり平成22年度以降も計画続行の予定である。

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

錦井 秀和 (NISHIKI HIDEKAZU)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：30512834