

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249033

研究課題名（和文） I型IFN α 依存性造血幹細胞統御による新規疾患治療法の創成

研究課題名（英文） Type-I IFN-dependent control of HSCs and its therapeutic applications for congenital and hematopoietic disorders

研究代表者

榑木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：50233200

研究成果の概要（和文）：I型IFNが造血幹細胞（HSC）に作用して活性化（一過性刺激）や分化を伴う減少（慢性刺激）を誘導することを見出した。これらの知見に基づき、I型IFNを用いた副作用の少ない骨髄移植法を確立し、同法を用いて先天性代謝異常症ムコ多糖症VII型の治療に成功した。またHSCと白血病幹細胞（LSC）の類似性状に着目し、イマチニブとI型IFNまたはその誘導剤を併用した慢性骨髄性白血病（CML）治療法を試行し一定の治療成績を得た。

研究成果の概要（英文）：We found that transient type I IFN signaling induced HSC activation and chronic type I IFN signaling further reduced the number of quiescent HSCs. Based on our findings, we established type I IFN-based preconditioning regimen without irradiation for HSC transplantation, which is applicable to the treatment of a congenital metabolic disorder, mucopolysaccharidosis type VII. In addition, the treatment of chronic myeloid leukemia (CML) with imatinib and poly(I:C), a type I IFN inducer, significantly reduced the recurrence rate of the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	19,700,000	5,910,000	25,610,000
2010年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	36,100,000	10,830,000	46,930,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：IFN, HSC, 骨髄移植, 先天性代謝異常症, LSC, CML

1. 研究開始当初の背景

I型IFNsはファミリーを形成するサイトカインの1つで、ほ乳類のさまざまな細胞から生産され生物学的に重要な機能を有している。ウイルス感染に際し、特に樹状細胞（dendritic cell、以下DC）から生産されるI型IFNsは、免疫系を活性化してウイルス抵抗性を付与する役割を担っている。しかしながら、造血系、特にHSCのホメオスタシスにおけるI型IFNsの機能は不明である。

申請者は、IFN- α あるいは代表的なI型IFNs誘導剤であるpoly I:Cをマウス生体内に投与するとHSCの増殖が誘導されること、またIFN- α やpoly I:Cの複数回投与による継続的かつ過剰なI型IFNsの刺激は、造血幹細胞（HSC）の機能的疲弊や分化促進に起因するHSCの減少に繋がることを見出した。

2. 研究の目的

これらの背景および知見に基づき、本研究課

題では主に以下の3点を目的とした。1つ目は、ウイルスなどの病原体感染時に DC から生産される I 型 IFNs の HSC ホメオスターシスに及ぼす影響の詳細とその免疫学的意義を明らかにすること。2つ目は、I 型 IFNs と従来の抗がん剤との組み合わせにより、LSC を標的とした慢性骨髄性白血病の治療法を確立すること。3つ目は、I 型 IFNs を用いた新規骨髄移植法を開発し、同法を用いた疾患治療を試行することである。

3. 研究の方法

(1) マウス

野生型 C57BL/6 (WT)、B6.*Ifnar1*^{-/-}、B6.*Ifngr1*^{-/-}、B6.SJL マウスは日本クレア、B&K Universal、Jackson Laboratory、Taconic から各々購入した。*Irf2*^{-/-} マウスは Tak Mak 博士から分与された。*Irf2*^{-/-}*Ifnar1*^{-/-} マウスは、*Irf2*^{-/-} マウスと *Ifnar1*^{-/-} マウスの交配により、*Ifnar1*^{-/-}*Ifngr1*^{-/-} マウスは、*Ifnar1*^{-/-} マウスと *Ifngr1*^{-/-} マウスの交配により各々作製した。ムコ多糖症 VII 型モデルマウス (B6.C-H2-K^{bml}/ByBir-Gusb^{mpps/J}) は Jackson Laboratory から購入した。すべての動物実験は、秋田大学および東京医科歯科大学の組換え DNA 実験安全委員会および動物実験委員会の審査・承認を経て遂行した。実験に当っては、各々の大学動物実験指針を遵守した。

(2) 再構築アッセイ

HSC の再構築能を評価するため、競合的および非競合的再構築アッセイを行った。競合的再構築アッセイでは、目的とする遺伝子改変マウスおよび WT マウスから骨髄細胞を採取、10:1 に混合して、致死量の放射線を照射した B6.SJL マウスに移入した。非競合的再構築アッセイでは目的とする遺伝子改変マウスの骨髄細胞あるいは精製した HSC を致死量の放射線を照射した B6.SJL マウスに移入した。その後、経時的にキメリズムを解析した。

(3) ウィルス感染

リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) Armstrong 株 2×10^5 pfu を静脈内注射により感染させた。

(4) 移植前処置

移植前処置として、レシーピエントマウスに poly(I:C) (10 mg/kg) と 5-FU (150 mg/kg)、あるいは poly(I:C) と 1.5 Gy または 3 Gy の放射線照射を行った。poly(I:C) は移植 6 日および 4 日前、5-FU は 2 日前、放射線照射は移植当日に各々行った。

(5) フローサイトメーター

c-Kit, Sca-1, CD3, CD4, CD8, B220, TER-119, CD49b, Gr-1, CD11b, CD25, CD45.1, CD45.2, CD41, CD48, CD150 を含む様々な分子に対す

る抗体で染色後、Moflo セルソーターを用いてソーティングを行い、FACSCantoII、FACSCalibur で解析した。

(6) 細胞周期の解析

目的とする遺伝子改変マウスおよび WT マウスから骨髄細胞を採取、Hoechst 33342 ならびに pyronin Y で染色後、Lin⁻Sca-1⁺cKit⁺ (LSK)-SP 分画の細胞周期を Moflo を用いて解析した。

(7) 統計処理

Student's t-test を行い、 $P < 0.05$ を有意水準 5% において有意であると判定した。

4. 研究成果

(1) 転写因子 IRF2 は HSC の自己複製能と多分化能を保護する

一過性の I 型 IFN 刺激が HSC の活性化を、持続的な I 型 IFN 刺激が HSC の分化に伴う減少を誘導すること、その分子メカニズムとして、前者は p27^{Kip1}、p57^{Kip2} などの CDK inhibitor 発現抑制が、後者は HSC の自己複製に重要な Thrombopoietin (TPO) 受容体 Mpl の発現抑制が、各々原因であることが推定された。I 型 IFN シグナルを抑制する転写因子 IRF2 を欠損する *Irf2*^{-/-} マウスでは、同腹 *Irf2*^{+/+} マウスとの比較において、持続的かつ過剰な生理的 I 型 IFN シグナルに起因する HSC の減少が観察された。さらに、*Irf2*^{+/+} マウスならびに *Irf2*^{-/-} マウスから精製した HSC を用いて再構築アッセイを行ったところ、*Irf2*^{-/-} HSC は自己複製能の低下と前駆細胞への分化促進が顕著であった。これらの知見は、静止期 HSC の維持における IRF2 の重要性を示唆しており、I 型 IFN を用いた副作用の少ない骨髄移植法を確立、さらには慢性骨髄性白血病 (CML) 治療法改善への可能性を提示していた。

(2) ウィルス感染における HSC の解析

本来、I 型 IFN はウイルス感染に伴い様々な細胞から産生され、ウイルスを排除するあるいはウイルス感染抵抗性を付与する役割が知られている。そこで、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 感染後、HSC の性状を解析したところ、細胞周期が進展する HSC と、静止期のままの HSC が存在することを見出した。さらに I 型および II 型 IFN 受容体二重欠損 (*Ifnar1*^{-/-}*Ifngr1*^{-/-}) マウスでは、LCMV 感染後も HSC の細胞周期の進展が認められず、かつ HSC へのウイルス感染効率が亢進した。従って、ウイルス感染時に産生される I 型 IFN は、造血系の回復維持と HSC 自身のウイルス抵抗性獲得に重要であることが示唆された。

(3) 新規骨髄移植法の開発と疾患治療への応用

従来のHSC移植は、高濃度の放射線照射あるいはアルキル化剤を用いるためDNA傷害や毒性などの副作用が強く、それら副作用を最小限に抑えたHSC移植前処置の確立が必要とされている。(1)の知見に基づき、I型IFNあるいはその誘導剤であるpoly(I:C)と5-FU、あるいはpoly(I:C)と1.5 Gy または3 Gy (従来の数分の1程度)放射線照射を前処置として用いた骨髄移植法を試行した。移植後7~8ヶ月の末梢血ドナー由来B細胞やミエロイド細胞の割合を指標に検討した結果、poly(I:C)あるいは5-FU単独で前処置したマウスにHSCを移植しても殆ど生着しないが(どちらも3%以下)、poly(I:C)および5-FUで前処置するとHSC生着効率が飛躍的に上昇した(約15~20%程度)。またpoly(I:C)および1.5 Gy または3 Gy (従来の数分の1程度)の放射線照射で前処置するとHSC生着効率がさらに上昇し、末梢血ドナー由来B細胞が約50%、同ミエロイド細胞が25%程度であった。

副作用の少ない前処置により一定程度のHSCを移植生着させることが可能になったので、同法を用いて先天性代謝異常症の1つ、ムコ多糖症VII型の治療を試みた。この疾患は、β-グルクロニダーゼ酵素(GUSB)欠損により、さまざまな組織や臓器のリソソームへのグリコサミノグリカンの蓄積とそれに因る機能不全を主徴とする。骨髄移植は治療法選択肢の1つであり、ドナー造血細胞の産生するβ-グルクロニダーゼ酵素により治療効果が期待できる。そこで、poly(I:C)および5-FUで前処置したムコ多糖症VII型モデルマウスにWTマウスHSCを移植した。その結果、GUSB活性を示すドナー由来B細胞、T細胞、ミエロイド細胞が各々15%、10%、10%程度を占めていた。基質を指標にしたGUSB活性は脾臓、肝臓、腎臓などでも確認した。さらに重要なことに、組織グリコサミノグリカン(コンドロイチン硫酸およびデルマタン硫酸)の低下および膨化リソソームの消失を指標とした病状の改善が観察され、poly(I:C)および5-FU前処置による骨髄移植の有効性が確認された(以上、投稿中)。今後は、同法と遺伝子治療を組み合わせた他の血液疾患への応用が期待できる。

(4) 新規慢性骨髄性白血病治療法の開発
HSCと白血病幹細胞(LSC)の類似性に着目し、イマチニブとI型IFNまたはその誘導剤を併用した慢性骨髄性白血病(CML)治療法の開発を目指し研究を推進した。最初に、p210 BCR-ABL 遺伝子を組み込んだpMSCVレトロウイルスベクターを骨髄細胞に導入し、同細胞を致死量の放射線照射マウスに移植することでマウス慢性骨髄性白血病(CML)モデルを構築した。次に、移植後10~20日にイマチニブを投与、イマチニブ投

与開始後3,5日目にpoly I:Cを投与する治療法を試行、一定の治療成績を得ることができた。本年度は、慢性骨髄性白血病(CML)モデルを用いて治療法の確立を目指した。移植後10~24日にイマチニブ(IM)を投与、イマチニブ投与開始後3,10日目にIFNの誘導剤であるpoly(I:C)を投与する治療法を試行し、その後IM投与中止によるCMLの再発について検討した。その結果、IM単独投与群ではCMLが再発したが、IMとpoly(I:C)の併用投与群では再発の頻度が明らかに低下した。併用投与群ではCML幹細胞の頻度も有意に減少しており、再発率の低下の要因と考えられた。同様の効果は、IMとIFN-αの併用投与群でも観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Mashima H, Sato T, Horie Y, Nakagawa Y, Kojima I, Ohteki T, Ohnishi H. Interferon regulatory factor-2 regulates exocytosis mechanisms mediated by SNAREs in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 141, 1102-1113 (2011). 査読有
- ② Liu J, Guo Y-M, Hirokawa M, Iwamoto K, Ubukawa K, Michishita Y, Fujishima N, Tagawa H, Takahashi N, Xiao W, Yamashita J, Ohteki T, Sawada K. A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 40, 330-341 (2011). 査読有
- ③ 榑木俊聡, 手塚裕之 pDCによる新たなIgA産生誘導メカニズム. *医学のあゆみ* 240, 182-183 (2012).
- ④ 榑木俊聡 pDCによる新たなIgA産生誘導の仕組み. *感染・炎症・免疫* 41, 83-84 (2011).
- ⑤ 手塚裕之, 安部由紀子, 榑木俊聡 形質細胞様樹状細胞によるT細胞非依存性IgA産生誘導機構. *臨床免疫・アレルギー科* 55, 687-692 (2011).
- ⑥ 榑木俊聡, 手塚裕之 T細胞非依存性IgA産生誘導における形質細胞様樹状細胞の質的優位性. *細胞工学* 30, 376-380 (2011).
- ⑦ Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, Ohteki T. Prominent role of plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* 34, 247-257 (2011). 査読有
- ⑧ Tezuka H, Ohteki T. A gas governing mucosal immunity. *Vaccine*, 28, 8039-8040 (2010). Review
- ⑨ Tezuka H, Ohteki T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 247-258 (2010). Review
- ⑩ 佐藤卓, 榑木俊聡 インターフェロンと白血病幹細胞. *血液フロンティア* 20,

- 439-447 (2010).
- ⑪ 樗木俊聡, 手塚裕之 TNF/iNOS 産生 DC と IgA 分泌. 医学のあゆみ 234, 453-457 (2010).
 - ⑫ 樗木俊聡, 佐藤卓 インターフェロンによる造血幹細胞の運命決定制御. 実験医学 28, 152-156 (2010).
 - ⑬ 佐藤卓, 樗木俊聡 I 型インターフェロン (IFN) シグナルによる造血幹細胞の機能制御. 感染・炎症・免疫 40, 279-282 (2010).
 - ⑭ Kanazawa Y, Saito Y, Supriatna Y, Tezuka H, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Kinouchi Y, Nojima Y, Ohteki T, Shimosegawa T, Matozaki T. Role of SIRP α in regulation of mucosal immunity in the intestine. *Genes Cells* 15, 1189-1200 (2010). 査読有
 - ⑮ Guo Y-M, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. *Blood* 115, 4569-4579 (2010). 査読有
 - ⑯ Asano J, Tada H, Onai N, Sato T, Horie Y, Fujimoto Y, Fukase K, Suzuki A, Mak TW, Ohteki T. Nod-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo*. *J Immunol* 184, 736-745 (2010). 査読有
 - ⑰ Yamada J, Hamuro J, Fukushima A, Ohteki T, Terai K, Iwakura Y, Yagita H, Kinoshita S. MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN- γ /IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 2139-2146 (2009). 査読有
 - ⑱ Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent haematopoietic stem cells from type-I interferon-dependent replicative exhaustion. *Nat Med* 15, 696-700 (2009). 査読有
 - ⑲ Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Ohteki T, Hibi T, Watanabe M. IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4⁺ memory T cells in Chronic colitis. *Eur J Immunol* 39, 2737-2747 (2009). 査読有
 - ⑳ 樗木俊聡, 佐藤卓 眠れる造血幹細胞を目覚めさせるインターフェロン. *DENTAL DIAMOND* 34, 80-85 (2009).
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 樗木俊聡 卓越した pDC 分化能をもつ新規 DC 前駆細胞の同定. 第 36 回皮膚科免疫セミナー, 2012 年 3 月 3 日, 東京
 - ② Sato T, Yotsumoto S and Ohteki T. Novel interferon (IFN)-based pretransplantation conditioning in the treatment of congenital metabolic disorder. 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011 年 11 月 28 日, 千葉
 - ③ 樗木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞制御. 第 22 回日本生体防御学会学術総会, 2011 年 6 月 30 日, 那覇
 - ④ 樗木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞の運命決定制御. 第 100 回日本病理学会ワークショップ 13, 2011 年 4 月 30 日, 横浜
 - ⑤ Ohteki T. Regulatory role of interferon in HSC homeostasis-an old cytokine with a new function. ESF-JSPS Frontier Science Conference Series for Young Researchers. "Cutting Edge Immunology and its Clinical Application". (H22 年度日本一欧州先端科学セミナー) 2011.3.2, The Netherlands.
 - ⑥ 樗木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞制御. 第 15 回信濃町 Gut フォーラム, 2010 年 11 月 5 日, 東京
 - ⑦ Ohteki T, Sato T. Regulatory role of interferon in HSC homeostasis. 69th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2010.9.23, Osaka
 - ⑧ Ohteki T. Regulatory Role of Interferons in HSC Homeostasis. The 1st JSH International Symposium 2010, 2010 年 7 月 16 日, 秋田
 - ⑨ 佐藤卓, 小内伸幸, 吉原宏樹, 新井文用, 須田年生, 樗木俊聡 IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日, 横浜
 - ⑩ 樗木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞の運命決定制御. 第 39 回日本免疫学会テクニカルセミナー 2009 年 12 月 4 日, 大阪
 - ⑪ Sato T, Onai N, Ohteki T. Decision of HSC fate by type-I IFN signaling. 第 39 回日本疫学会学術集会, 2009 年 12 月 3 日, 大阪
 - ⑫ 樗木俊聡 インターフェロンによる粘膜免疫系・造血系制御. 秋田消化管機能と免疫研究会 2009 年 9 月 18 日, 秋田
 - ⑬ 樗木俊聡 眠れる造血幹細胞を目覚めさせるインターフェロン. 第 15 回箱根山ワークショップ, 2009 年 9 月 15 日, 東京
 - ⑭ 樗木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞制御. 第 16 回八幡平造血セミナー 2009 年 9 月 5 日, 盛岡
 - ⑮ Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Manz MG. Identification of clonogenic common plasmacytoid and dendritic cell progenitors (CDP) in mouse bone marrow. The 9th World Congress on Inflammation. Tokyo 2009.7.8, Tokyo

- ⑩ 榑木俊聡 インターフェロンによる粘膜免疫系・造血系制御. 日本ウイルス学会第6回ウイルス学キャンプ 2009年6月29日,湯河原
- ⑪ 榑木俊聡 Decision of HSC fate by type I interferon. ノバルティス秋田免疫セミナー 2009年6月25日,秋田

[図書] (計8件)

- ① 佐藤卓 インターフェロンシグナルによる造血幹細胞の機能制御. Annual Review 血液 2011. pp.1-7 (2011).
- ② 手塚裕之, 榑木俊聡 共生の成立・維持における宿主機能. 腸内生態系を調整する消化管防御システム. 丸善出版, (財)日本ビフィズス菌センター(編) 腸内共生系のバイオサイエンス. pp.173-182 (2011).
- ③ 浅野純平, 榑木俊聡 IL-1. 朝倉書店, 桂義元, 河本 宏, 小安重夫, 山村一彦(編) 免疫の事典. pp.49 (2011).
- ④ 四元聡志, 榑木俊聡 IL-15. 朝倉書店, 桂義元, 河本 宏, 小安重夫, 山村一彦(編) 免疫の事典. pp.61 (2011).
- ⑤ 小内伸幸, 榑木俊聡 common γ chain. 朝倉書店, 桂義元, 河本 宏, 小安重夫, 山村一彦(編) 免疫の事典. pp.192 (2011).
- ⑥ 手塚裕之, 榑木俊聡 腫瘍壊死因子. 朝倉書店, 桂義元, 河本 宏, 小安重夫, 山村一彦(編) 免疫の事典. pp.245 (2011).
- ⑦ 小内伸幸, 榑木俊聡 LAK 細胞. 朝倉書店, 朝倉書店, 桂義元, 河本 宏, 小安重夫, 山村一彦(編) 免疫の事典. pp.429 (2011).
- ⑧ 手塚裕之, 安部由紀子, 榑木俊聡 粘膜系樹状細胞(誘導組織). (株)シナジー, 清野宏(編) 臨床粘膜免疫学. pp.266-274 (2010).

[その他]

(1)報道関連情報

Sato T et al., Nat Med 15, 696-700 (2009) に関する記事が, 朝日新聞, 毎日新聞, 日本経済新聞, 中日新聞, 秋田さきがけ, 岩手日報, 河北新報, 京都新聞, 高知新聞, 下野新聞, 北日本新聞, 福島民報, 神戸新聞, 西日本新聞, 静岡新聞, 大阪日日新聞, 参院中央新聞, 東京新聞, 徳島新聞, 長崎新聞, 福井新聞, 岐阜新聞, 茨城新聞, 佐賀新聞, 山梨日日新聞, 山陽新聞, 四国新聞, 沖縄タイムスなどの6月1日朝刊およびウェブ上に掲載された。
2009年6月1日

(2)ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/bre/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

榑木 俊聡 (OHTEKI TOSHIAKI)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号: 50233200